

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Medicina Física y Rehabilitación (Hidrología
Médica)**



**ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE ASPECTOS
VEGETATIVOS DE GÉRMEENES EN AGUAS
MINEROMEDICINALES Y SIEMBRA DIRECTA-
FILTRACIÓN POR MEMBRANA DE LAS AGUAS DEL
MANANTIAL E INSTALACIONES CRENOTERÁPICAS
DEL BALNEARIO DE ALANGE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Concepción Serrano Moreno

Eqp la direcci3n de las Rtdhguqtcu
Josefina San Mart3n Bacaicoa y Margarita Romero Mart3n

Madrid, 2004

- **ISBN: ; 9: /: 6/8; 4/4642/7**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA Y REHABILITACIÓN
HIDROLOGÍA MÉDICA**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE ASPECTOS VEGETATIVOS DE
GÉRMENES EN AGUAS MINEROMEDICINALES Y SIEMBRA
DIRECTA/FILTRACIÓN POR MEMBRANA DE LAS AGUAS DEL
MANANTIAL E INSTALACIONES CRENOTERÁPICAS DEL
BALNEARIO DE ALANGE**

TESIS DOCTORAL

CONCEPCIÓN SERRANO MORENO

MADRID 2004



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina

MARGARITA ROMERO MARTÍN, Profesora Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública del Dptº de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de la Ciencia, y **JOSEFINA SAN MARTÍN BACAICOA** Catedrática de Hidrología Médica del Dptº de Medicina Física y Rehabilitación. Hidrología Médica, de la Universidad Complutense de Madrid

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo de investigación titulado “**Estudio experimental sobre aspectos vegetativos de gérmenes en aguas mineromedicinales y siembra directa / filtración por membrana de las aguas del manantial e instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange**” realizado por Doña **CONCEPCIÓN SERRANO MORENO** con nuestra dirección para la obtención del Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, reúne los requisitos exigidos por el método científico para dar respuesta a los objetivos que se plantea y para su defensa pública.

Y así lo firman en Madrid a día siete de Mayo de dos mil cuatro

Margarita Romero Martín

Josefina San Martín Bacaicoa

A

Donato Serrano Pereira
y
Concepción Moreno Fajardo

mis Padres

In Memoriam

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a las directoras de este estudio la Profesora Doña Josefina San Martín Bacaicoa insigne Maestra de la Hidrología Médica por sus generosas y permanentes enseñanzas, y a la Profesora Doña Margarita Romero Martín por toda su ayuda.

Al Profesor Dr. D. José Prieto Prieto Catedrático, y a la Profesora Dra. Doña M^a Luisa Gómez-Lus Centelles Profesora Titular, del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de esta Universidad Complutense de Madrid, por su universitaria acogida e importante ayuda, y asimismo, a los Dres. D. Luis Alou Cervera, Doña Carmen Ramos Tejera, Don Javier Hernando Bugella, Don David Sevillano Fernández y demás miembros del equipo de investigación del Departamento por su constante ayuda para el trabajo de laboratorio.

A la Dra. Doña Margarita Baquero Mochales Jefe del Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos III de Madrid y a la Dra. Doña Mercedes Subirats Núñez por su universitaria acogida e importante ayuda para el estudio con la *Legionella pneumophila* y de parásitos en el estudio de campo.

Al Señor Consejero Delegado de BALNEARIO DE ALANGE S.A. Don Luis Miguel Fernández-Chiralt Fernández y esposa Doña M^a Dolores Navarro Tevar, y asimismo al Sr. Gerente Don Fernando Fernandez-Chiralt Navarro, destacados Gestores y Protectores de la tradicional y moderna Balneoterapia, por su comprensión y atenta expectativa.

A Doña Andrea Lozano Chaves Secretaria Jefe de Administrativos del Balneario de Alange, al Encargado General y de Personal e Instalaciones Don Santiago López Cabrera y a Doña Josefina Gil Cortés ambos Coordinadores y Técnicos de Balneoterapia, a los, asimismo, Técnicos Doña Maria Vicenta Carrasco Belloso, Doña Felisa Dios Belloso, Don Francisco Berdonce Calero, y a todo el Personal Actual y Emérito del Centro por su importante y siempre profesional colaboración.

A las jóvenes Manuela Sánchez Serrano y Ana Sánchez Serrano, mis sobrinas, en reconocimiento de sus capacidades y de su imprescindible ayuda en el procesamiento informático.

A toda mi Familia por su apoyo y afecto, y a Andrés Callejo Escobar†, por su confianza en esta investigación.

A Don Hilario Romero Hidalgo† y a Doña María Martín Díaz, y familia, por su siempre amistad y especiales atenciones durante el largo tiempo de realización de este estudio.

A la admirable y generosa Naturaleza que nos dona las AGUAS MINEROMEDICINALES, cuyo ORIGINAL EQUILIBRIO DEBEMOS PRESERVAR.

MENCIÓN ESPECIAL

A la Preclara Familia Sereniana que ya en el Siglo III de nuestra Era supo utilizar la capacidad curativa del agua manantial, sobre el que erigió las sólidas Termas que caracterizan al Noble Municipio de Alange, cuyas autoridades y vecindario, plenos de cualidades ciudadanas, junto a Balneario de Alange S.A., han sabido dar continuidad a aquella iniciativa, no solo con su muy apreciable y actual oferta de servicios y cuidados del entorno, sinó también con una depurada capacidad de acogida y trato a quienes acuden a sus aguas, todo lo cual valoramos, de acuerdo con la doctrina de la Hidrología Médica, como investigadoras y especialistas del Centro Termal, por su importancia, tanto para facilitar el proceso terapéutico y de bienestar de los bañistas, como para defender la calidad original de su Agua Mineromedicinal.

INDICE

| | |
|---|--------|
| INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN | pág. 2 |
|---|--------|

GENERALIDADES SOBRE EL ORIGEN, ESTRUCTURA, CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DEL AGUA ORDINARIA. PECULIARIDADES DE LAS AGUAS MINEROMEDICINALES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

| | |
|--------------------------------|---------|
| El Agua Ordinaria | pág. 11 |
|--------------------------------|---------|

Aguas Mineromedicinales:

| | |
|---|---------|
| -AGUAS SULFATADAS SÓDICAS HIPERTÓNICAS | pág. 16 |
| -AGUAS BICARBONATADAS SÓDICAS / CARBOGASEOSAS | pág. 18 |
| -AGUAS OLIGOMINERALES BICARBONATADAS MIXTAS | pág. 21 |
| -AGUAS RADIATIVAS | pág. 23 |

CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA MICROBIANA EN GENERAL, DE LA FLORA DE AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE LOS GÉRMESES PATÓGENOS CONTAMINANTES MAS FRECUENTES EN INSTALACIONES BALNEARIAS

| | |
|---|---------|
| Generalidades sobre Biología y Ecología Microbiana | pág. 28 |
|---|---------|

| | |
|---|---------|
| Biología y Ecología de la Flora de las Aguas Mineromedicinales | pág. 45 |
|---|---------|

Biología y Ecología de los Gérmenes Patógenos Frecuentes Contaminantes en Instalaciones Balnearias, aquí estudiados:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| - <i>Stafilococcus aureus</i> | pág. 51 |
| - <i>Escherichia coli</i> | pág. 54 |
| - <i>Pseudomona aeruginosa</i> | pág. 58 |
| - <i>Legionella pneumophila</i> | pág. 63 |

| | |
|------------------------|---------|
| HIPÓTESIS | pág. 69 |
|------------------------|---------|

| | |
|------------------------|---------|
| OBJETIVOS | pág. 72 |
|------------------------|---------|

MATERIAL Y MÉTODOSpág. 75

□ **Protocolo de Microbiología:**

*Material de Estudio para la contaminación experimental:pág. 75

-Criterios de Inclusión-

- a) Microorganismos
- b) Aguas Mineromedicinales
- c) Agua ordinaria de la red de abastecimiento
- d) Agua destilada

-Instrumental - Medios de Cultivo - Reactivos-

*Método de Trabajo en Microbiología:

♦ Contaminación Experimental de las Aguas:pág. 86

- a) Control previo de esterilidad de las aguas del estudio
- b) Curvas de letalidad:
 - 1) Preparación de los inóculos bacterianos
 - 2) Contaminación experimental del caldo nutritivo y de las aguas con los inóculos e incubación en baño
 - 3) Dilución y siembra en placas del caldo nutritivo y de las aguas una vez contaminados e incubación en estufa
 - 4) Recuento de los gérmenes inoculados experimentalmente en el caldo nutritivo y en las aguas, y cálculo de las curvas de crecimiento
- c) Valoración de la expresión enzimática inicial y de sus posibles cambios en los gérmenes estudiados

♦ Estudio microbiológico del agua manantial, del agua servida y de las instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange:.....pág. 92

• Sistemática del estudio de laboratorio:

- a) Recuento bacteriano directo de las aguas del manantial y de las aguas servidas (piscinas)
- b) Búsqueda de *L. pneumophila* SG1, de algas y amebas en aguas del manantial, en las aguas servidas (piscinas) y en las instalaciones crenoterápicas

• Sistemática del Estudio de Campo:

- a) Siembra e incubación para el estudio de campo por el Sistema Microfilm (Millipore) de las aguas manantiales y servidas del Balneario de Alange

- b) Prueba rápida para la detección de *L. pneumophila* en el agua y en sus instalaciones crenoterápicas
- c) Prueba de antigenuria de *L. pneumophila* en personal técnico de administración y de terapias del Balneario.

*Métodos Estadísticospág. 96

□ **Protocolo de Hidrología Médica:**pág. 97

-Instrumental y Reactivos-

*Método de trabajo en Hidrología Médica:

·Determinaciones analíticas

RESEÑA DEL BALNEARIO DE ALANGE:.....pág. 102

- Características Generales e Historia del Lugar
- Breve Resumen Histórico del Balneario
- Instalaciones del Complejo Hidrotermal
- Indicaciones Generales de la Cura en Alange

RESULTADOSpág. 122

I.- Del estudio experimental sobre vegetatividad de gérmenes patógenos en aguas mineromedicinales:

-Vegetatividad de los gérmenes en agua el Sulfatada-Sódica-Hipertónica:pág. 123

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

| | |
|---|----------|
| <u>-Vegetatividad de los gérmenes en agua Bicarbonatada Sódica:</u> | pág. 130 |
|---|----------|

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

| | |
|---|----------|
| <u>-Vegetatividad de los gérmenes en agua Carbogaseosa:</u> | pág. 136 |
|---|----------|

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

| | |
|---|----------|
| <u>-Vegetatividad de los gérmenes en agua Oligomineral Bicarbonatada Mixta:</u> | pág. 142 |
|---|----------|

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

| | |
|---|----------|
| <u>-Vegetatividad de los gérmenes en agua Radiactiva:</u> | pág. 149 |
|---|----------|

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

| | |
|--|----------|
| <u>-Valoración conjunta de la vegetatividad de los diferentes gérmenes del estudio en las aguas aquí investigadas:</u> | pág. 156 |
|--|----------|

- A) *S. aureus* coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico
- B) *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico
- C) *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico
- D) *L. Pneumophila* SG1 cepa Philadelphia

II.- Estudio microbiológico de las aguas e instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange:

| | |
|----------------------------------|----------|
| A) Estudio de Laboratorio: | pág. 163 |
|----------------------------------|----------|

- 1) Siembra directa de las aguas del manantial y de las aguas servidas (piscinas)
- 2) Búsqueda de *L. pneumophila* SG1, de algas y amebas en aguas del manantial, en las aguas servidas (piscinas) y en las instalaciones hidroterápicas

| | |
|----------------------------|----------|
| B) Estudio de Campo: | pág. 165 |
|----------------------------|----------|

- 1) Filtración por membrana de las aguas manantiales y servidas (piscinas)

- 2) Test de enzimoimmunoensayo para la detección de *L. pneumophila* en las aguas e instalaciones crenoterápicas
- 3) Test de enzimoimmunoensayo para antigenuria de *L. pneumophila* en personal técnico de administración y de terapias del balneario

DISCUSIÓN

I.- Sobre los resultados del estudio experimental realizado con las formas ATCC y de Aislado Clínico de los gérmenes y aguas incluidos en la investigación:.....pág. 168

S. aureus

E. coli

Ps. aeruginosa

L. pneumophila SG1

en aguas mineromedicinales y de control:

Sulfatado-Sódica-Hipertónica.

Bicarbonatada Sódica

Carbogaseosa

Oligomineral Bicarbonatada Mixta

Radiactiva

Agua Destilada

Agua de la red de abastecimiento

II.- Sobre los resultados del estudio de laboratorio de las aguas e instalaciones crenoterápicas y del estudio de campo en el Balneario de Alange:.....pág. 191

- A) Recuento bacteriano en el laboratorio mediante siembra directa, y asimismo búsqueda de *L. pneumophila* SG1 en las aguas del establecimiento termal
- B) Filtración por membrana y test de detección de *L. pneumophila* realizado *in situ* a las aguas, instalaciones y personal perteneciente a este centro

CONCLUSIONESpág. 196

TABLAS E ICONOGRAFÍApág. 201

BIBLIOGRAFÍApág. 341

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

| | |
|------------------|--|
| SG1 : | Serogrupo 1 |
| ATCC: | American Type Collection Culture |
| Aisl. Clin.: | Aislado Clínico |
| UFC ó u.f.c.: | Unidades Formadoras de Colonias |
| BCYE- α : | Buffered Charcoal Yeast Extract - α ketoglutaric acid |
| API: | Analitical Profile Index |
| API ZYM : | Sistema API para determinación de enzimas microbianas |
| RII : | Reducción del Inóculo Inicial |
| S.S.H. : | agua Sulfatado-Sódica-Hipertónica |
| B.S. : | agua Bicarbonatado-Sódica |
| CRB. : | agua Carbogaseosa |
| OLIG. : | agua Oligomineral bicarbonatada mixta |
| RAD. : | agua Radiactiva |

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La posible contaminación del agua y en particular del agua de consumo, viene siendo una preocupación médica desde Hipócrates que, como es bien sabido, sentó las bases de la medicina racional, y ya señalaba que *el agua contribuye de modo significativo a la salud individual y de la colectividad* y asimismo que *el agua de lluvia debía hervirse y colarse ya que de lo contrario olería mal y prodría provocar ronquera y otros males*.

La observación de la transcendencia de la calidad de las aguas con las que se relacionaban los pueblos ha preocupado, sin duda, a las civilizaciones que nos han precedido, las cuales utilizaban, entre otros recursos, la filtración para mejorar su aspecto y/o sabor y, aún sin saberlo, en alguna medida su higiene; sin embargo, los historiadores antiguos apenas mencionan el concepto de calidad del agua y hasta fechas relativamente recientes no se ha contado con referencias sobre, al menos, las características estéticas que debía cumplir el agua^{1,2}.

El progresivo agrupamiento de la humanidad en medios urbanos fué superando la capacidad higiénica de aquellos recursos de tratamiento, pasando a ser el agua protagonista de asoladoras epidemias como las que tuvieron lugar cuando el Cólera pasó a Europa en el siglo XIX.

Fué en Londres donde el médico John Snow, mediante un estudio epidemiológico que se considera pionero en la Epidemiología Científica³, demostró la relación existente entre el consumo de agua de una fuente que se mezclaba con las fugas de una alcantarilla cercana, y la epidemia de Cólera que sufría el vecindario que se abastecía de ella, lo cual determinó que, además de controlar la fuente, se promulgara una ley, ya en 1852, *por la que toda el agua que se utilizara en la ciudad debería filtrarse*.

El desarrollo de la bacteriología y el correspondiente análisis del agua, en este sentido, puso de manifiesto la abundante flora microbiana tanto saprofita como patógena que puede estar presente en el agua procedente de muy diversas fuentes ó reservorios, tales como el intestino humano y animal, vertidos residuales, suelos contaminados, etc.^{4,5}.

Las demostraciones de laboratorio⁶ hechas ya a principios del siglo XX sobre la existencia de microorganismos patógenos capaces de sobrevivir facilmente en los medios hídricos y de ser transmitidos por ellos cuando se contaminan, pusieron de manifiesto, ya de manera objetiva, que el agua no controlada constituye un importante problema de Salud Pública⁷.

La obligada atención de dicho problema ha determinado que los distintos países, a partir de las recomendaciones de organismos internacionales como OMS -que ya había dado Estándares sobre el agua al inicio de los años 60-, la FAO, PNUC, y otros organismos de la ONU -cuya Asamblea General ya proclamó al periodo 1981-90 Decenio Internacional del Agua- para profundizar en su estudio, fueran actualizando la correspondiente legislación y normativa para la vigilancia sanitaria de los abastecimientos de agua tanto para uso en bebida como externo^{8,9,10}.

En España, los antecedentes de la regulación oficial del suministro y del control sanitario del agua ordinaria parten de la Ley de Aguas de 1879, y se apoyan en reales decretos y reales órdenes dados en 1908, 1912, 1920, 1923, así como en el Reglamento de Sanidad Municipal de 1925, en la Ley de Bases de Sanidad de 1944, en el Código Alimentario Español de 1967, la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el Abastecimiento y Control de Calidad de las Aguas Potables de Consumo Público de 1982 y de 1990 que ya incluye la Directiva 80/778/CEE, así como en 1985 la que se puede considerar la 3ª Ley de Aguas.

Pero, si hasta aquí se hace referencia a la importancia que tienen para la humanidad los aspectos sanitarios del agua ordinaria, es preciso, al hablar ahora del Agua Mineromedicinal, nombrar de nuevo a Hipócrates, pues ya en los inicios de nuestra cultura dejó constancia *del efecto terapéutico que el adecuado uso de muchas aguas manantiales proporciona* a lo que cabe añadir que aquellos médicos solían ejercer su profesión entorno a los manantiales^{11,12}.

En cuanto a la correspondiente regulación y/o condiciones para el adecuado uso de las Aguas Mineromedicinales en España, se cuenta con^{13,14} los “Fueros de Sepúlveda, Teruel, Salamanca, Cuenca y Plasencia” dictados por los reyes Alfonso VI, Alfonso II de Aragón y Alfonso VIII, con las “Leyes de las Cortes de Alcalá” sobre *aguas y pozos salados*, y las “Ordenanzas de Toledo” de Alfonso XI sobre *servidumbres de aguas y baños*, y asimismo con las “Ordenanzas de la Reina Isabel” dadas en 1495 sobre *el buen uso de los baños y la necesidad de la presencia de un -físico-*.

Mas inmediato en el tiempo es el Decreto de 1816 promulgado por Fernando VII en el que se establecen las primeras *pautas legales para la atención de los manantiales y posibles instalaciones*, aprobándose el primer Reglamento de Aguas y Baños Minerales de España en 1817 en el que se establecen las *normas de explotación y control de las aguas mineromedicinales* estipulándose la *asignación de los médicos directores*. En 1834 se reformó este Reglamento añadiéndose, entre otras referencias, la de *la inspección general de los baños y aguas minerales*.

Asimismo, en 1868 se publicó un nuevo Reglamento que estuvo vigente hasta 1874, en ese momento ya aparece una cuarta Reglamentación que se mantuvo hasta 1928 y en la que, entre otras normas, se hacen más explícitas las *tareas de inspección y control de las aguas mineromedicinales que debe hacer el médico-director*.

Las citadas tareas de inspección y control de las Aguas Mineromedicinales que, como cabía esperar, la legislación ha asignando al médico-director, cuentan para su apoyo desde 1866 con la primera Ley de Aguas, en ella se dictaron medidas para *evitar el perjuicio que los estancamientos y/o filtraciones pudieran ocasionar a la salud pública*, y asimismo con la Ley de Aguas de 1879 en la que se trata lo relativo *al dominio público, limitaciones de la propiedad y aprovechamiento de las aguas alumbradas* actualizándose todo ello en el Capítulo Primero del Título IV del Código Civil promulgado en 1889.

Junto a la normativa dada en 1921 para la Regulación de la “introducción y venta en España de las aguas mineromedicinales extranjeras”, el Real Decreto-Ley de 1928 estableció un nuevo *Estatuto sobre la explotación de manantiales de aguas mineromedicinales*, efectuándose en 1934 la Catalogación y Aprovechamiento de Manantiales y Aguas Subterráneas.

Tras la creación en 1943 de la Junta Asesora, dependiente del Ministerio de la Gobernación, para la atención de los asuntos Médico-Farmacéuticos, asuntos Industriales y asuntos de Hostelería y Hospedería relacionados con Balnearios y Aguas Mineromedicinales, entró en vigor la Ley de Minas de 1944 y se publicó en 1949 la Reglamentación del Trabajo en los Establecimientos Balnearios según Orden del Ministerio de Trabajo.

En el Decreto de 1967 se aprobó el texto del Código Alimentario Español donde, como antes se ha referido, se dan normas higiénicas para la utilización y consumo del agua ordinaria, y en 1972 se regulan Las Aguas de Bebida Envasadas, entrando dicho Código Alimentario en vigor en 1974. Sin embargo, es en 1975 cuando se emite la normativa sobre Regulación de las *especificaciones microbiológicas a las que han de ajustarse las aguas mineromedicinales envasadas*.

Es en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de Bebidas Envasadas de 1981, que clasifica a las aguas de bebida envasadas como -“aguas mineromedicinales, minerales naturales, de manantial, potables preparadas, y aguas de consumo público”-, donde también podemos encontrar las exigencias de calidad físico-química y microbiológica así como los correspondientes límites, y en los años 1983 y 1987 respectivamente *los métodos oficiales de análisis microbiológicos de Aguas Potables de Consumo Público* y *los correspondientes a la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas*, habiéndose puesto además en vigor la que se puede considerar como la “tercera Ley de Aguas” en 1985.

La adhesión de España a la Comunidad Económica Europea determinó la necesidad de armonizar nuestra legislación con las disposiciones comunitarias y en 1990 se aprobó la *Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público* de acuerdo con la correspondiente Directiva Comunitaria, y asimismo en 1991 la *Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de las aguas de bebida envasadas* así como directivas posteriores¹⁵.

A toda esta legislación general para el agua ordinaria y para el agua mineromedicinal cabe añadir, en el caso de esta última, la dictada por las diferentes Autonomías tras habérseles transferido las competencias en esta materia.

La hasta ahora referida legislación, aparecida progresivamente para regular el uso público del agua, ha ido imponiendo, tal y como se ha visto, el empleo de recursos mecánicos, físicos y químicos en la higienización del agua ordinaria para consumo de la comunidad, y, asimismo, las condiciones higiénicas que deben cumplir las aguas minerales envasadas.

En el caso de las aguas mineromedicinales utilizadas para baño, a fin de preservar su equilibrio original, la legislación las ha venido dejando exentas de dichos tratamientos, siempre que estuvieran libres de gérmenes patógenos en su emergencia y mantuvieran constantes dicha pureza y su composición, una vez declaradas, por todo ello y por sus efectos terapéuticos, -aguas de uso público-.

La delimitación y respeto a su perímetro de protección así como las estrategias para evitar, en general, todos los posibles riesgos contaminantes, la permanencia de las condiciones del agua en cada temporada, las estadísticas de usuarios, y las incidencias clínicas, entre otros datos, es el contenido de las obligadas Memorias Anuales de los Centros Termales redactadas por sus Médicos como reflejo de su labor de control.

Precisamente la valoración de la constancia de los caracteres organolépticos y de las condiciones químicas de las aguas mineromedicinales, junto a la habitual “ausencia de brotes de enfermedades infectocontagiosas de transmisión hídrica” en los balnearios, que efectivamente se ha venido registrando, justifica la “excepción de tratamientos higiénicos” que hasta ahora se ha concedido a estas aguas. No obstante, el riesgo de que se puedan contaminar, a pesar de las precauciones, es una permanente amenaza, y los correspondientes efectos de esa contaminación constituirían a todas luces, sin duda, un problema de Salud Pública, tal y como ya planteara, a finales del siglo XIX, el dramaturgo Henrik Ibsen en su inmortal obra “Un enemigo del pueblo”.

Sin embargo, las condiciones organolépticas de las aguas mineromedicinales, diferentes a las del agua ordinaria, el equilibrio hidromineral al que tendrían que adaptarse los gérmenes, que sí pueden estar presentes en aquella -cambiando quizá su virulencia-, y la propia microflora/fauna, por su posible efecto competidor, se ha invocado, sin duda, a lo largo de décadas para explicar la citada ausencia/escasez

de brotes epidémicos de transmisión hídrica en los Balnearios¹⁶, todo ello, hasta ahora, sin demostración científica.

Pero frente a la secular “excepción de tratamientos higiénicos” con la que la Administración ha tratado las condiciones a las Aguas Mineromedicinales, en los últimos años la legislación para prevenir la Legionelosis, como neumonía adquirida en la comunidad, dictada en el Real Decreto 909/2001 de 27 de Julio de 2001, no mantiene ya aquella “excepción” y, a pesar del dudoso resultado de la cloración como principal medida higiénica al respecto, la impone a los Centros Termales ya que los cita como medios de su ámbito de aplicación.

Las alegaciones hechas por la Cátedra de Hidrología Médica a partir, entre otros, de los resultados de esta investigación que ya estaba en curso, y por la Asociación Nacional de Estaciones Termales, para evitar el tratamiento químico sistemático de las aguas mineromedicinales, capaz de alterar su equilibrio original, se han tenido en cuenta en el posterior Real Decreto 861/2003 de 18 de Julio de 2003 en el que se argumentan las medidas de prevención de la Legionelosis para las distintas instalaciones de la comunidad, que como tales ya se tenían y se observaban en los Balnearios, no obligando en ausencia de brote a la cloración sistemática en los medios termales.

Considerando esta última cuestión y para contribuir al estudio del comportamiento -en el agua mineromedicinal- de los gérmenes patógenos que pueden transmitirse por el agua ordinaria, consideramos justificada esta investigación con la que se pretende confirmar que es oportuna “la excepción en la que se ha tenido siempre a las Aguas Mineromedicinales a efectos de preservarlas de tratamientos que pudieran alterar sus características originales y como consecuencia sus efectos terapéuticos tan ampliamente hoy utilizados”.

Precisamente y en lo que se refiere a el interés de su utilización como recurso de salud a nivel internacional, fué en 1953, de forma simultanea al desarrollo de nuestra legislación, cuando se constituyó la Agrupación Europea de Fuentes y Aguas Minerales (GESEM), organizándose dentro de ella la Unión Europea de Fuentes de Aguas Minerales (UNESEM) que en los años 60 y 70 con sus propuestas contribuyó a perfilar muchos aspectos de definición y funcionalidad para mejor uso de las aguas mineromedicinales, como en la actualidad se continúa haciendo bajo el auspicio de la Asociación Mundial de Termalismo. Atendiendo las manifestaciones de aquella primera organización, el Consejo de Europa, en Estrasburgo ya en 1962, autorizó a los habitantes de los países entonces asociados que pudieran utilizar de forma indistinta “las emergencias mineromedicinales” de todo el territorio dado su probado interés terapéutico.

En este mismo sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO) han emitido normas específicas y reguladoras dada la importancia que para la salud tienen las Aguas Mineromedicinales, destacando la OMS en 1982 precisamente que “la evaluación clínica de la terapéutica hidromineral no debe diferir de la de los medicamentos” a los que implícitamente equipara.

El importante desarrollo durante las dos últimas décadas del ya preexistente Termalismo Social en Europa, al que también se ha sumado España, no hubiera sido posible sin la consideración y comprobación de que las -curas termales son una terapéutica eficiente-^{17,18} que, en efecto, experimenta de forma continuada un incremento de su número de beneficiarios, por todo ello, está suficientemente justificada la correspondiente defensa de la integridad de las Aguas Mineromedicinales a partir del estudio del efecto que causan en los gérmenes patógenos que a ellas pudieran llegar.

**GENERALIDADES SOBRE EL ORIGEN, ESTRUCTURA,
CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DEL AGUA
ORDINARIA. PECULIARIDADES DE LAS AGUAS
MINEROMEDICINALES UTILIZADAS EN ESTE
ESTUDIO**

El Agua Ordinaria

En nuestra cultura, un primer argumento sobre el origen del “AGUA” se encuentra en el Libro del Génesis, donde se explica que el agua fue creada por Dios inmediatamente después del Cielo y de la Tierra precediendo a otras creaciones, de ella aceptamos que además de ser -principio de vida, es fundamento de la relación social y también principio de salud-¹⁹. Su materialización²⁰ pudo hacerse posible necesariamente tras un enfriamiento del magma inicial ya que los elementos integrantes del agua no pueden mantenerse unidos por encima de 1.300° C.

Junto a este argumento originario, y tras una larga sucesión de evaporaciones y precipitaciones que contribuirían al progresivo enfriamiento de la superficie terrestre, ésta quedaría cubierta de un mar caliente en cuyo seno abundaban elementos y más tarde compuestos capaces de contribuir a la vida. La naturaleza ha mantenido la secuencia de evaporación-precipitación determinando, tras dicho enfriamiento, el llamado Ciclo del Agua ahora al amparo de la energía solar que determina un importante nivel de vaporización a partir sobre todo de las grandes superficies oceánicas y como consecuencia los distintos perfiles climáticos²¹.

Los movimientos tectónicos y el enfriamiento de rocas en la profundidad han dado lugar, entre otras circunstancias, a la existencia de aguas subterráneas a las cuales también contribuyen las de precipitación cuando se infiltran.

Las Aguas Mineromedicinales son un caso particular de estas aguas subterráneas²² en cuyo origen participan las de infiltración, llamándose entonces -aguas de infiltración- las cuales tienen sobre todo mineralización térrea, caudal dependiente de las lluvias y temperatura casi siempre inferior a 30° C; a su vez y al margen de las precipitaciones encontramos en las mineromedicinales las llamadas -aguas primitivas- dependientes de la condensación del vapor que desprenden áreas con

roca fundida en las profundidades, estas aguas presentan escasas variaciones en su caudal, brotan en fallas y suelen tener una temperatura superior a las anteriores, su mineralización es escasa siendo frecuentemente radioactivas; las -aguas mixtas- son un tercer grupo de aguas mineromedicinales, obedecen por lo general al encuentro entre una corriente de infiltración y otra ascendente que inicialmente era primitiva.

La condición mineromedicinal le vendrá dada a un agua por el reconocimiento de que por su composición y características puede ser utilizada con fines terapéuticos, debiendo ser estables en el tiempo tanto su equilibrio químico como sus características²³.

Si partimos de la necesidad vital que del agua se tiene, y del condicionamiento que supone los tres estados en los que se presenta, la historia de los distintos pueblos y, en suma de la humanidad, está sin duda notablemente determinada por el agua ya que la viene utilizando no solo para saciar su sed y en su alimentación, sino también como recurso terapéutico y asimismo para la relación social y recreo, admitiéndose que un indicador de civilización sería el grado de diálogo que llegan a establecer las distintas comunidades con el agua²⁴.

Pero el conocimiento científico de los elementos que la forman y la descripción y justificación de sus propiedades^{25,26} no comenzó hasta el siglo XVIII cuando Macquer y Priestley observaron que la combustión de hidrógeno en el aire se acompañaba de la formación de agua, apoyándose también en las investigaciones de Cavendish, Lavoisier, Morley, Watt y Gay-Lussac que sucesivamente fueron aportando datos para dicho conocimiento.

El actual estudio de su estructura^{27,28,29} permite afirmar que una molécula de agua está integrada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno en enlace covalente por el cual comparten dos electrones quedando los átomos de H y O enlazados mediante pares de electrones comunes; esta estructura, según Lewis, es muy estable pues en este tipo de enlace se consigue precisamente la estabilidad de gas noble.

Por otra parte, en los elementos del grupo del oxígeno los ángulos de enlace en los compuestos resultantes deben ser de 90° , en el caso del agua este ángulo es de $104^\circ 26'$ siendo esta diferencia debida a la repulsión entre los átomos de hidrógeno, circunstancia que confiere carácter iónico al enlace H-O .

Asimismo la asimetría en la disposición espacial de las cargas eléctricas origina un campo eléctrico no equilibrado que determina que la molécula del agua tenga carácter polar siendo su momento dipolar elevado ya que alcanza $-1,84 \text{ D}$.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, a los resultados del estudio y descripción de la molécula del agua en singular, debe añadirse el de la disposición que el conjunto de moléculas configura entre sí para dar lugar a la estructura del agua, habiendo servido para ello la observación de la disposición que adoptan cuando el agua se congela.

En efecto, ya en 1912 Tamman y Bridgman demostraron que junto a la estructura que alcanzan en el -sólido ordinario- (hielo I), por congelación del agua líquida podían encontrarse otras expresiones estructurales (hielo III, V, VI y VII), como consecuencia de variar la presión, pudiéndose obtener asimismo por cambios polimorfos a partir de dichas formas sólidas, los hielos II, VIII y IX .

No obstante, son diversos los grupos de autores que han aportado teorías y modelos capaces de explicar la estructura del agua desde que en 1933 Bernal y Fowler iniciaran esta tarea, siendo el resultado la propuesta de hasta cuatro tipos de modelos de estructuras : -hielo-, -enlace deformado-, -hidrato de agua- y -racimos fluctuantes-.

Las citadas estructuras, en esencia, están relacionadas con las variaciones de su densidad en función de la temperatura, ó a las variaciones de su estructura también con ésta, junto a la inclusión de más moléculas de agua dentro de la red que éstas forman logrando así la hidratación de dicha agua, y por último sus dos estados de

equilibrio, ya en forma voluminosa, ya en forma densa, que están en continuo intercambio, habiendo demostrado la difracción con rayos X que existen semejanzas entre las estructuras de las formas sólidas y líquidas del agua.

Asimismo Stillinger aporta a la modelización el hecho de que en el agua líquida las moléculas se disponen formando una malla tridimensional de enlaces de hidrógeno distribuidos al azar, malla que presenta una preferencia local por la geometría tetraédrica aún conteniendo gran proporción de enlaces rotos ó distorsionados, todo lo cual justificaría las propiedades físico-químicas del agua las cuales están en relación con los átomos que componen las moléculas, con el tipo de enlace entre ellos, con las posiciones que ocupan en el espacio y asimismo con las fuerzas que se ejercen entre las moléculas.

Relacionada con su excepcional estructura³⁰ y dada su naturaleza polar, el agua es un excelente disolvente, tal y como se demuestra con los compuestos iónicos que se disuelven por las fuertes atracciones electrostáticas con los dipolos del agua formando iones hidratados muy estables así como por la elevada constante dieléctrica del agua.

En el caso de los compuestos no iónicos la solubilidad se consigue al formar enlaces de hidrógeno con las moléculas del agua y fijándose dentro de su estructura casi sin distorsionarla. Para las sustancias no polares también es posible la disolución probablemente por medio de la ocupación de las cavidades preexistentes en la estructura del agua. Asimismo su capacidad solvente en condiciones superiores al punto crítico (374,2° y 218,3 atmósferas) son excepcionales.

Todo lo afirmado anteriormente, que se corresponde con el agua ordinaria, es también válido, aún con algunas peculiaridades, para el agua mineromedicinal que desde el punto de vista de su concepto físico-químico se define como <<una fase heterogénea constituida por una suspensión de sustancias orgánicas e inorgánicas,

en una disolución normalmente diluida de compuestos orgánicos e inorgánicos, cuyo solvente es la especie química que conocemos como agua>>.

Considerando que el agua es el componente mayoritario de las aguas mineromedicinales, en particular las propiedades físicas de aquella, son las que prevalecen sobre las de los demás componentes confiriendo también a las aguas mineromedicinales sus peculiares características y propiedades físicas, químico-físicas y químicas.

No obstante lo anterior, que sería una afirmación general, en las aguas mineromedicinales las propiedades químicas se van a modificar y van a depender considerablemente de los elementos mineralizantes que contengan lo cual además orienta su clasificación y sus efectos^{31,32}.

A continuación pasamos a considerar las peculiaridades de las aguas mineromedicinales que hemos utilizado en el estudio experimental y en el estudio de campo realizados en esta investigación.

Las Aguas Mineromedicinales

– AGUAS MINERALES SULFATADAS SÓDICAS HIPERTÓNICAS

Son aguas³³ que como mínimo presentan 1 gramo de mineralización por litro y muestran un predominio del anión sulfato sobre los restantes teniendo en ellas menor importancia los cationes. En la naturaleza predominan las de fuerte mineralización ó hipertónicas con baja temperatura ya que son aguas superficiales que suelen originarse en terrenos sedimentarios de diversa estratificación, y resultan del efecto de lixiviado que ejercen sobre los yacimientos de sulfato que atraviesan. En su mayoría emergen en terrenos miocénicos y eocénicos. Cuando son sulfatado-sódicas de débil mineralización pueden encontrarse en terrenos triásicos e incluso en el carbonífero.

En general las aguas sulfatadas son inodoras, de sabor amargo, en ellas pueden figurar otros aniones en particular el cloruro y el bicarbonato determinando entonces la condición de sulfatadas mixtas; su contenido catiónico suele ser sodio magnesio y calcio.

El Azufre, elemento constitutivo de su anión principal, tiene importantes efectos sobre los organismos vivos, pertenece con el oxígeno, el selenio y el telurio al grupo VI de la tabla periódica. Su forma natural es una mezcla de cuatro isótopos no radioactivos aunque el ^{32}S constituye más del 95 por 100 de ese conjunto. Su única variedad sólida estable es el llamado azufre rómbico ó - azufre α - que es insoluble en agua y presenta un color amarillo característico. La presentación

amorfa del $-S_8-$ es el azufre coloidal y proporciona el tono azulado a las aguas mineromedicinales que lo contienen³⁴.

Las valencias principales del azufre son -2 , $+3$, $+4$ y $+6$, y en función del estado de oxidación se pueden originar gran cantidad de oxiácidos y sulfuros que se encuentran como ácidos y sales; en las aguas mineromedicinales interesan en primer lugar aquellos compuestos cuyo grado de oxidación es -2 , es decir, el sulfuro de hidrógeno, sulfhidratos y sulfuros y asimismo los de estado $+6$ que son los sulfatos.

Los compuestos de azufre con oxidación -2 se comportan como agentes reductores y su presencia en las aguas está en relación con el pH de éstas. En las aguas mineromedicinales, los elementos oxidantes capaces de atraer la acción reductora del azufre son principalmente el oxígeno disuelto, el hierro trivalente y los nitritos que determinan la formación del azufre coloidal que a veces está presente en estas aguas y en sus biogéneas.

La oxidación de los sulfuros y otros compuestos reducidos de azufre, y/o la incorporación desde su amplia distribución en la naturaleza permite la presencia de sulfatos en las aguas mineromedicinales que son muy estables y resistentes a la oxidación, presentan molécula tetragonal y pares de electrones compartidos en enlace a diferencia del sulfuro de hidrógeno y derivados cuya molécula es angular y no comparte electrones.

Las aguas Minerales Sulfatadas Hipertónicas Sódicas que aquí se han utilizado tienen sobre los organismos vivos acciones claramente demostradas³⁵; así, en el tubo digestivo difunden escasamente a través de la pared quedando retenidas en la luz intestinal hacia donde atraen agua para con ello corregir dicho medio hacia la isotonicidad, esta circunstancia determina un notable aumento del volumen contenido en intestino y con ello la estimulación mecánica de su pared que traerá

como consecuencia un aumento del ritmo peristáltico, aceleración del tránsito intestinal y vaciamiento de ese contenido, el cual como consecuencia contendrá gran proporción de agua habiéndose modificado la concentración hipertónica inicial, asimismo tienen una acción irritante, hiperemiante y modificadora del equilibrio coloidal del epitelio. Por otra parte, frente a los otros tipos de aguas sulfatadas, las sulfatadas sódicas empleadas en este estudio son las que mayor presión osmótica ejercen gracias a su peso molecular y capacidad de disociación.

Estas, entre otras acciones, son las observables como reacción general del tubo digestivo, pero es preciso decir que, a nivel celular, las aguas sulfatadas sódicas estimulan la actividad enzimática, en particular, la transaminasa glutámico pirúvica, y elevan el nivel de las peroxidasas las cuales tienen una importante actividad antitóxica. Asimismo descongestionan vías respiratorias, presentan un efecto antioxidante e igualmente modifican favorablemente la presión arterial,^{36,37,38,39} también son notables los efectos en aplicación tópica y afecciones dermatológicas^{40,41}.

- AGUAS BICARBONATADAS SÓDICAS / CARBOGASEOSAS

Para que un agua sea bicarbonatada^{42,43} debe en ella predominar el anión Bicarbonato el cual a su vez ha de sobrepasar el veinte por ciento de la totalidad del contenido aniónico; se admite que en estas aguas está presente un exceso de anhídrido carbónico, bien disuelto, bien combinado en forma de bicarbonatos, de las que puede liberarse si cambian las iniciales condiciones de ese equilibrio, precisamente su pH que, debería ser siempre alcalino, muchas veces es neutro ó ligeramente ácido a causa de la citada presencia del gas carbónico.

Los puntos de emergencia de las aguas bicarbonatadas / carbogaseosas suelen ser los límites de los terrenos volcánicos y sedimentarios especialmente en el mioceno lacustre, y su formación depende de la reacción entre el cloruro sódico y la sílice que tiene lugar en el seno de la Tierra en presencia de agua. Del silicato sódico así formado deriva el bicarbonato pudiéndose combinar más tarde con otros elementos como el sodio, calcio, magnesio, manganeso, estroncio, níquel, cobalto, etc., éstos últimos poco frecuentes, así como con los aniones cloruro y sulfato según los contengan las zonas que atraviesa, en particular si son terrenos sedimentarios^{44,45}.

El predominio del sodio frente a los otros cationes es lo determinante en las aguas bicarbonatadas sódicas, las cuales en relación con los seres vivos y con independencia de aplicaciones externas van a demostrar sus efectos sobre todo en tubo digestivo y a partir de él en todo el organismo.

En efecto, inciden sobre la acidez gástrica neutralizándola, enriquecen de bicarbonato el duodeno y desde ahí alcalinizan el medio interno logrando así el mismo resultado que los antiácidos sistémicos farmacológicos. Asimismo fluidifican la secreción mucosa entérica como consecuencia de mejorar el trofismo de sus células.

Junto al efecto alcalinizante general, a nivel extraentérico se atribuyen a las aguas bicarbonatadas sódicas capacidad de influir frente a trastornos metabólicos y endocrinos observándose una acción favorable en la Diabetes Mellitus al favorecer la glucogénesis y potenciar el efecto de la insulina estimulando el paso de la glucosa a nivel celular donde favorecerían toda la función metabólica.

En este mismo nivel celular, Messini demostró que las aguas bicarbonatadas sódicas tienen acción sobre las enzimas estimulando la desulfuración y la dehidrogenación, e igualmente Aguirre y San Martín que comprobaron una

significativa reducción de la esteatosis hepáticas de ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono al tratarlas con este agua.

En cuanto a la condición carbogaseosa que suelen presentar las aguas bicarbonatadas, depende de si contienen dióxido de carbono libre que en función de la cantidad determinará su clasificación, en este sentido existen varias, considerándose a partir del Reglamento de Aguas de Bebidas Envasadas de 1991 <<aguas aciduladas>> las que contengan más de 250 mg/l de carbónico libre que le confieren un sabor peculiar.

Se considera que el dióxido de carbono es libre cuando permanece químicamente independiente de toda posible unión ó ligadura para formar sales, precisamente su presencia en forma libre va ligada a una demostrable acción disolvente frente a sales de hierro y calcio que se precipitan cuando estas aguas pierden el gas, bien por contacto con el aire ó por el aumento de la temperatura.

En general este anhídrido carbónico se hidrata en el agua para formar ácido carbónico que condiciona su sabor ácido, por lo general no permanece libre mucho tiempo, ya porque se deshidrata, ó porque se une a bases fuertes para formar carbonatos y bicarbonatos.

Cuando se ingiere un agua carbogaseosa la mayor parte de su ácido carbónico se neutraliza ó elimina en el propio tubo digestivo donde ha condicionado previamente, junto a una ligera anestesia apreciable en los tramos altos y por ello utilizada para disimular malos sabores, un estímulo de la secreción y de la motilidad así como vasodilatación del lecho submucoso que facilitará la absorción tanto del agua como de los otros contenidos que hubiera en digestión.

Por todo lo anterior, aunque la porción que permanece libre es escasa, no obstante se absorbe y determina efectos sistémicos tales como un breve aumento de la

alcalinidad sanguínea al que sucede una discreta elevación del pH de la orina seguido de un incremento de la diuresis. El contacto del agua a nivel externo va seguido de una reacción de fácil tolerancia a temperaturas mas bajas de la de la piel al recubrirse ésta de burbujas así como por su acción vasodilatadora e hiperemiante. De igual forma, vía terminaciones cutáneas y mediante estímulo reflejo, determina estimulación glandular y activación de las funciones hepáticas, pancreáticas, renales y neurohipofisarias.

A nivel celular se admite que el dióxido de carbono / ácido carbónico tienen una gran actividad pudiendo intervenir en función de las presiones parciales internas y externas en las cadenas enzimáticas y con ello en el metabolismo celular lo que explicaría el efecto detoxicante de las aguas bicarbonatadas / carbogaseosas.

- AGUAS OLIGOMINERALES

Son aguas de bajísimo contenido mineral ⁴⁶ en las que no obstante están presentes tanto los cationes sodio, calcio y magnesio, como los aniones cloro, sulfato y bicarbonato, entre otros, y así mismo elementos tales como el potasio, manganeso, plata, hierro, zinc, vanadio, uranio, etc., aunque todos ellos en cantidades mínimas. Según la predominancia se clasificarán como oligominerales u oligometálicas bicarbonatadas sódicas, cálcicas, mixtas, ó sulfuradas cloruradas, ó sulfatadas cálcicas, etc., y aún radiactivas si presenta esa condición.

Estas concentraciones oligominerales antes se nombraban también como oligometálicas y en nuestro país, además, se correspondían con aguas cuyo residuo seco a 110° C por litro de agua alcanzaba hasta 100 mg; en la actualidad el ya citado Reglamento de Aguas Minerales Envasadas de 1991 considera aguas de

“mineralización muy débil” cuando su residuo seco alcanza de 50 a 500 mg/l , por lo que en ellas están incluidas las oligominerales/oligometálicas, y como de “mineralización fuerte” a las que producen un residuo seco de más de 1.500 mg/l, considerándose en la práctica todas las demás como de “mineralización media” aunque no figuren explícitamente en la correspondiente relación.

En cuanto al origen, estas aguas oligominerales brotan en terrenos variados frecuentemente paleozoicos, ó sea de la era primaria, en zonas básicas graníticas, gneísicas, porfídicas ó basálticas; también en terrenos de la era secundaria ó mesozoica, es decir, en áreas cretáceas y triásicas.

La temperatura en sus puntos de emergencia abarca un amplio intervalo, clásicamente cuando tienen menos y hasta 20° C. se las denomina -acratopegas- y si superan dicha cifra -acratotermas-, en este sentido la Prof^a San Martín propone que a su vez las acratotermas hagan referencia a la temperatura de 35° C. ya que si superan ese valor son útiles para aplicaciones tópicas mientras que las que no lo alcanzan suelen consumirse como aguas de mesa y/ó diuréticas^{47,48}. Las aguas oligominerales son incoloras, transparentes, insípidas y muy frecuentemente radiactivas particularmente las de mineralización muy baja.

La acción sobre los seres vivos es compleja pues a pesar de la escasa mineralización, y precisamente por ella, estas aguas determinan efectos por su estructura fisicoquímica, disociación electrolítica, contenido coloidal e hipotonía, entre otras circunstancias, todo ello en relación además con la vía de administración^{49,50}.

En los organismos superiores su ingestión va seguida de una rápida absorción, sobre todo, debida a mecanismos osmóticos, por los que pasa al líquido intersticial de la pared intestinal y desde allí al torrente circulatorio donde es absorbida por los hematíes; se suaviza así la dilución del plasma que no obstante es la que

determinará un aumento de la filtración glomerular y por tanto de la diuresis gracias además a la regulación hipofisaria que estimulan los osmo-presorreceptores. Junto a todo lo anterior, desde el plasma pasa el agua a los tejidos para repartirse en los espacios intersticial e intracelular donde determina un removimiento, es decir, un drenaje del agua que en ellos había para ocupar su lugar con lo que se consigue una renovación hídrica.

Las aguas oligominerales de mediana mineralización tienen un efecto diurético^{51,52} mayor que el agua potable ordinaria y que el agua destilada. Además de arrastrar el agua orgánica son capaces de arrastrar sustancias nitrogenadas, purinas, ácido oxálico, úrico y aún fosfórico lo que confiere a estas aguas, además, un efecto descongestionante así como analgésico, antiespasmódico y decontracturante utilizadas también en aplicación tópica.

Si todo lo hasta ahora dicho es la respuesta global del organismo frente al estímulo de las aguas de baja mineralización, a nivel celular la respuesta también es demostrable y está en relación con la osmolaridad del líquido intersticial, con la compleja composición química del medio intracelular y aún con el posible transporte -activo- a través de la membrana; el conjunto de estos mecanismos es lo que parece contribuir a que las células se comporten como osmómetros aunque la explicación última de este comportamiento es compleja.

- AGUAS RADIATIVAS

Siguiendo al Profesor Armijo Valenzuela⁵³, se consideran aguas radiactivas aquellas que con independencia de las que puedan ser sus características físicas y composición química ofrecen la peculiaridad de poder emitir radiaciones

ionizantes, en la mayoría de los casos debido a su contenido en radón y, raras veces, a mínimas cantidades de elementos radiactivos de origen natural. Aunque lo más frecuente es que emitan radón, también es posible encontrar en ellas cantidades mínimas de las tres familias radioactivas tales como <uranio-actinio, uranio-radium y torio>⁵⁴.

La condición radiactiva es frecuente en la mayoría de las aguas mineromedicinales^{55,56} dada la alta difusión de los núclidos radiactivos en la naturaleza, particularmente si se originan ó discurren en la profundidad flanqueadas por terrenos graníticos ó en antiguas zonas volcánicas, desde donde se añade a aquellas para presentarla como propiedad general junto a las propias de su mineralización. Precisamente la impregnación radiactiva es fácil en las aguas oligominerales en las que suele alcanzar valores altos y disminuye en las aguas muy mineralizadas.

Asimismo, la llamada radiactividad de fondo es una constante en todos los ambientes naturales relacionados con la tierra, el aire y el agua a los que se añade la del fondo cósmico y, como consecuencia, la vida en esos medios está sometida a su influencia.

En efecto, al ciclo del agua se suma ahora el llamado ciclo de la <radiactividad natural> por el que las partículas y gases radiactivos son vehiculizados por el agua que los barre del aire cuando cae en cualquier forma de precipitación, los infiltra hasta capas telúricas impermeables donde se añaden a la radiactividad natural que allí hubiera y desde donde los arrastra de nuevo al exterior cuando por rebosamiento fluye hacia fuera.

La condición radiactiva resulta de la capacidad de ciertos elementos químicos inestables para desintegrar espontáneamente su núcleo atómico el cual se transmuta así a otro elemento determinando la liberación de radiación ionizante en forma de

partículas y/o energía. Las partículas subatómicas así formadas y que constituyen la ya citada radiación ionizante, son las alfa, beta, neutrones y también la radiación electromagnética como son los rayos X o la radiación gamma que, aunque presentan esencialmente las mismas propiedades, se diferencian en que los rayos X se originan de procesos que tienen lugar entre las capas electrónicas más internas de los átomos y la radiación gamma nace dentro del núcleo es más energética y tiene mayor poder de penetración que aquellos.

Interesa también conocer si la radiactividad que presentan las aguas mineromedicinales es temporal o permanente pues en este último caso hay riesgo de acumulación en el organismo. Afortunadamente esto no suele suceder ya que los núclidos con periodos de semidesintegración prolongados se encuentran en la naturaleza en formas nada o muy poco solubles por lo que es raro que se incorporen a las aguas y si lo hacen es en muy escasa proporción. En este sentido la actividad debida al radón alcanza solamente 3,82 días y no produce riesgo de acumulación orgánica, y sus inmediatos descendientes, algo mas peligrosos, son escasamente solubles en el agua quedando retenidos en los terrenos.

En las aguas radiactivas el factor preponderante es el radón que se absorbe principalmente por vía respiratoria seguida de la piel, mucosas y vía digestiva. El baño en este agua permite su paso a través de la piel y simultáneamente por el pulmón sobre todo si se agita el agua ó esta contiene carbónico natural ó aportado para facilitar su liberación. Tomar baños en bañera cubierta para mejorar la absorción cutanea, en gabinetes techados y pequeños, así como agitando el agua para mejorar su inhalación, permite obtener los efectos de la radioemanación en este caso radiación α que por su carga y masa son núcleos de átomos de helio (dos protones y dos neutrones) que tiene bajo poder de penetración pero un elevadísimo poder ionizante el cual unido a su energía (4 a 6 MeV) determina sus acciones sobre el organismo⁵⁷.

El elemento fijador del radón es el tejido graso que al estar distribuido en todo el organismo permite que sus efectos sean así universales y apreciables como estimulante de los elementos formes de la sangre, como regulador del sistema nervioso vegetativo y central⁵⁸ así como relajante y antiespasmódico de la fibra muscular lisa; la acción diurética suele relacionarse con la condición radiactiva y sobre todo oligomineral que suelen tener estas aguas, capaces también de estimular el sistema hipofisiosuprarrenal y las glándulas endocrinas.

Con todo, sus indicaciones terapéuticas buscan sus efectos sedantes, relajantes, reguladores, analgésicos y antiinflamatorios siendo probadamente útiles en las -Distonías Neurovegetativas- tanto con manifestaciones cardiovasculares como respiratorias, digestivas, urinarias y aún ginecológicas⁵⁹. Asimismo en los -Procesos Reumáticos y secuelas de Traumatismos- aportan gran acción analgésica y antiinflamatoria pudiendo también contribuir eficazmente a la normalización de la -Hiperuricemia- gracias a la mejora de la uricosuria y equilibrio metabólico. El efecto descongestionante las hace también útiles en -Dermopatías- que cursan con prurito como son la atopia, eccemas y urticarias así como las manifestaciones alérgicas y disreacionales con expresión no solo dérmica sino también respiratoria, digestiva y alimentaria, entre otras.

Junto a las anteriores indicaciones destaca la del tratamiento de las neurosis con manifestaciones somáticas y/o psíquicas, los estados depresivos, neurastenias, psicastenias, los trastornos psicofuncionales, síndromes ansiosos, inadaptaciones, y otros cuadros relacionados con el actual estilo de vida, todo ello gracias a los efectos sedantes y reguladores de las aguas radiactivas apoyados por la espontánea psicoterapia que se promueve en el medio hidrotermal^{60,61,62}.

**CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE BIOLOGIA Y
ECOLOGÍA MICROBIANA EN GENERAL, DE LA
FLORA DE AGUAS MEDICINALES Y DE LOS
GÉRMENES PATÓGENOS CONTAMINANTES EN
TERMALISMO MAS FRECUENTES.**

Biología y Ecología Microbiana

La gran diferencia que existe entre las células microbianas y las células animales ó las vegetales es que las microbianas pueden vivir sin formar tejidos, es decir, aisladas en la naturaleza de forma libre e independiente⁶³.

Esta circunstancia, la independencia, obliga a la célula microbiana a mantener activados y en adecuado equilibrio las organelas que intervienen en todos sus procesos vegetativos, tales como crecimiento, generación de energía y reproducción junto a una lectura constante de las condiciones del medio en el que tiene que desenvolverse.

El impacto que el ambiente, y sus cambios, produce en los organismos que logran sobrevivir en él, se traduce en programas funcionales de adaptación que, si tienen éxito, dejarán huella en sus correspondientes mapas genéticos. Los microorganismos como los demás seres vivos parten de una determinación genética que se expresará, se inhibirá ó mutará según las circunstancias, dando lugar a la correspondiente selección.

A continuación revisamos la “expresión biológica” y las “circunstancias ecológicas” con las que se manifiestan y en las que se desarrollan los microorganismos en general así como los que constituyen la flora de las aguas mineromedicinales y aquellos gérmenes patógenos que con más frecuencia pueden aportarse a dichas aguas con motivo de su contaminación en la profundidad, en el punto de emergencia ó por su uso en balneación, habida cuenta de que al amparo de la legislación vigente tanto en nuestro país, como en otros, para preservar el equilibrio hidromineral, no se procede a su cloración.

La consideración de la *estructura-función* de la célula microbiana supone la base de su biología⁶⁴, en este sentido se parte de que la célula es una unidad dinámica que sufre cambios constantemente y modifica los elementos que la constituyen. Incluso cuando no están creciendo, estos microorganismos unicelulares toman continuamente materiales de su entorno y los transforman en material propio, sus productos de desecho también los liberan al medio siendo en esencia estas células microbianas, un -sistema abierto- que está en continuo cambio pero en el que dichas células permanecen siendo las mismas.

Este sistema abierto no está equilibrado y tiene que mantener su estructura hecho que consigue invirtiendo buena parte de la energía que toma del entorno. En su multiplicación, y en la reproducción en general, lo que esencialmente se transmite es “la estructura” que será capaz de generar la correspondiente función vital.

La “función vital” ó funcionamiento de una célula está en relación directa con su capacidad metabólica y ésta a su vez con la cantidad y diversidad de enzimas que posea. En efecto, una célula es un laboratorio capaz de realizar múltiples transformaciones químicas tanto biosintéticas como degradativas para todo lo cual debe contar con las adecuadas enzimas las cuales son moléculas proteicas, polímeros constituidos por largas cadenas de aminoácidos interconectados de modo específico y altamente preciso.

Además de contar con las enzimas, la función vital es resultado de la capacidad codificadora de las células, es decir, de la capacidad de disponer los aminoácidos de una proteína ó los carbonos de un azúcar con la secuencia adecuada para generar el compuesto que en ese momento necesite, y a la vez guardar esa información para reutilizarla cuando convenga ó para transmitirla. La codificación microbiana está contenida en la molécula del DNA capaz de replicarse antes de cada división para que cada nueva célula reciba toda la información de éxito para la sobrevivencia que se ha ido acumulando en los genes.

Complementando la función codificadora están las funciones de -transcripción y traducción- por las cuales se hace posible que existan en el citoplasma copias de los tramos que interesen del DNA y asimismo que éstas determinen la formación de las proteínas que convengan según las condiciones que se estén presentado en el medio.

Desde el punto de vista biológico, la relación armónica entre estructura y función dará lugar tanto a la sobrevivencia como a la multiplicación celular, no obstante, aunque exista esa armonía, ocasionalmente aparecen errores en la copia del DNA, es decir, mutaciones, y la célula hija no es el clon de la madre como es la norma en los microorganismos.

Las consecuencias de las mutaciones son generalmente perjudiciales, en algunos casos intrascendentes, y en otros ventajosas al conseguirse con ella la formación de una proteína más funcional que la que estuviera presente en la célula parental. Cuando aparece esta última circunstancia la célula que muestra esta -ventaja selectiva- puede reemplazar al tipo parental determinando la selección natural observable en los procesos evolutivos. El valor de las mutaciones depende del entorno en el que vive el organismo y a su vez las causas de las mismas vienen determinadas igualmente por las condiciones de ese entorno.

Pero la funcionalidad de este sistema abierto que es la célula, y en particular la célula microbiana, teniendo en cuenta su permanente independencia y de ahí su característica de no formar tejidos, es posible gracias a las distintas expresiones de su “capacidad estructural”. En este sentido el elemento más externo que nos muestran los microorganismos es la barrera ó pared celular, la cual presenta una consistencia relativamente rígida que protege a su vez a otra estructura algo más flexible pero de composición semejante que es la membrana celular, ambas estructuras encierran una compleja mezcla de ribosomas, elementos, moléculas

orgánicas, agua e iones inorgánicos, entre otras sustancias, que constituyen el citoplasma.

Por otra parte, las diferencias apreciables en la estructura y en la organización interna de las células ha determinado su clasificación en -procariotas- y -eucariotas- perteneciendo a éstas últimas no solo algas, hongos y protozoos, sino también las células de los organismos pluricelulares tanto vegetales como animales.

En el caso de las procariotas, éstas incluyen dos únicas ramas evolutivas que son “Bacteria” y “Archaea” las cuales, a diferencia de las eucariotas, nunca han evolucionado más allá del nivel microbiano si bien se admite que orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos filogenéticamente pueden relacionarse con la rama Bacteria y por el proceso de -endosimbiosis- acabaron integrándose en el citoplasma de la célula eucariota hace miles de millones de años tras un extenso tiempo de colaboración⁶⁵.

Pues bien, a Bacteria pertenecen todos los procariotas causantes de enfermedades, ó sea los microorganismos patógenos, y la mayoría de las bacterias que se encuentran en el suelo, aguas, tracto digestivo de animales y en muchos otros medios. A su vez a Archaea⁶⁶ también le corresponden, como ya hemos dicho, procariotas pero los que así se clasifican en su mayor parte son anaerobios estrictos ya que se han ido seleccionando de manera que no logran vivir al aire libre por haber modificado sus condiciones de vida para adaptarse a ambientes poco frecuentes tales como:

- Fuentes Termales (incluso las que presentan temperaturas extremas)
- Lagos Salinos
- Suelos próximos a yacimientos
- Aguas muy ácidas ó muy alcalinas

pudiendo incluso producir metano como parte esencial de su metabolismo, y demostrando una capacidad asombrosa para sobrevivir a pesar de condiciones fisicoquímicas extremas⁶⁷.

En este sentido, es preciso considerar también cuales son los principales procesos químicos que tienen lugar en la célula microbiana, y en síntesis cabe decir que las células contienen alrededor de 20 elementos distintos presentando cierta abundancia solo seis de ellos tales como hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre por lo que se conocen como bioelementos los cuales presentan las capas más externas de sus átomos sistemáticamente incompletas por lo que tienden a combinarse con otros átomos para formar moléculas mediante enlace químico ya iónico, covalente ó de hidrógeno cuyas capas electrónicas externas sean estables.

Asimismo, aunque no se consideren enlace químico, cabe tener en cuenta otras interacciones moleculares como son las “fuerzas de Van der Waals” y las “interacciones hidrofóbicas”. Las primeras son de -atracción inespecífica- y median muchas veces en la unión de sustratos a enzimas y entre proteínas y ácidos nucleicos. Las segundas actúan en ese mismo tipo de unión pero al agruparse las moléculas no polares en el ambiente acuoso influyen en la determinación espacial de macromoléculas sobre todo proteicas.

En la química microbiana, como en la de otras células, el agua citoplasmática juega un papel especial ya que supone entre un 70% y un 90% de su peso, y asimismo por que el agua es el solvente biológico ideal dada su polaridad debida a la diferente electronegatividad de los dos elementos que la forman. Además, la polaridad del agua permite la formación de puentes de hidrógeno que determinará la estructura global de las macromoléculas tanto proteínas como ácidos nucleicos y forzará la agregación de las sustancias no polares como los lípidos contenidos en la membrana que facilitan que ésta sea barrera para las moléculas polares que han de fluir a su través.

Junto a todo lo anterior, es preciso decir que los principales componentes químicos de las células en general, y también de las microbianas, son las estructuras llamadas macromoléculas las cuales son polímeros integrados por unidades estructurales repetitivas llamadas a su vez monómeros.

Existen cuatro tipos de macromoléculas que se subdividen en -portadoras de información- como son las proteínas y los ácidos nucleicos (cuyos monómeros son los aminoácidos y los nucleótidos respectivamente) y las -no portadoras de información- tales como los polisacáridos y los lípidos (constituidos por azúcares y ácidos grasos en lo que corresponde a la estructura monomérica). Estos dos últimos tipos de macromoléculas abundan precisamente en la pared y membrana celular determinando en buena parte las características y comportamiento de los microorganismos en relación con su ambiente ⁶⁸.

Asimismo, de las macromoléculas portadoras de información, cabe decir que son imprescindibles para asegurar la transferencia de los rasgos genéticos de una generación a otra y para que la célula sea lo que es gracias al nivel de proteínas, ya catalíticas (enzimas), ya estructurales, que posee tanto en su pared y membrana como en el citoplasma.

En su relación con el ambiente externo, la pared de los microorganismos presenta diferencias estructurales en gran medida adaptativas que se ponen de manifiesto, entre otras técnicas, con la sencilla tinción de Gram. La pared en Bacteria, está constituida por una estructura denominada tetrapéptido de glicano -peptidoglicano (ó mureína)- integrado por cadenas de azúcares conectadas por puentes de aminoácidos en una proporción del 90% si la célula es Gram (+), que además suele contener ácidos teicóicos, y en un 10% si es Gram (-) en cuyo caso también se encuentra LPS (lipopolisacárido).

En cuanto a Archaea, la pared suele ser muy variada estando algunas presente un -pseudopéptidoglicano- y en otras no, siendo común entre ellas la existencia de una capa superficial paracrística (capa S) de proteína ó glicoproteína.

Como respuesta también al ambiente, además de contar con membrana, los microorganismos se apoyan en la estructura y funcionalidad de su material genético, en la existencia ó no de órganos de locomoción como flagelos y cilios, ó de adherencia ó recepción como fimbrias y pili y de resistencia como son las endosporas no siempre presentes y en muchos casos con alto nivel de termorresistencia.

Tanto en Bacteria como en Archea el DNA de la célula se presenta como molécula única generalmente circular, covalentemente cerrada y no acomplexada con histonas. Dicha molécula no está envuelta en membrana ni se acumula para formar nucleolo pero cumple su misión, como en la célula eucariota, de controlar las funciones vitales y la multiplicación del microorganismo.

Revisados a grandes rasgos los principales elementos de la estructura, pasamos a considerar “la función”, es decir, los integrantes de la capacidad de adaptación y/o sobrevivencia de los microorganismos. La función de nutrición y metabolismo requiere el anabolismo/biosíntesis, por la cual la célula, merced al correspondiente proceso bioquímico, apoyado en la energía luminosa ó en la oxidación de compuestos como aporte de energía, sintetiza el material que necesita a partir de los “nutrientes” que incorpora del medio, ya sean macronutrientes como P, S, Mg, Ca, Na, Fe ó micronutrientes, en forma de elementos traza, sobre todo Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Se, W, V, Zn, y Fe este último en mayor cantidad que los precedentes.

Además de lo que precede, los microorganismos también requieren los llamados “factores de crecimiento” que son compuestos orgánicos tales como vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas los cuales cuando aquellos no pueden

sintetizarlos, como habitualmente ocurre, han de tomarlos del medio. Por todo ello es conveniente que los incluya cualquier medio general de cultivo en el laboratorio.

En balance permanente con la función de síntesis, los gérmenes desarrollan su catabolismo a partir de la correspondiente -energía de activación- que es la requerida para llevar a las moléculas potencialmente reaccionantes a su estado reactivo. Para reducir la energía de activación e incrementar la velocidad de las reacciones, las células microbianas, y también las eucariotas cuentan con las “enzimas ó catalizadores” que son de naturaleza proteica a las que pueden unirse moléculas no proteicas tales como los -grupos prostéticos- y las -coenzimas-.

La función metabólica microbiana, apoyada en todo lo anterior, incluye la reacción de Oxido-Reducción, del Transporte de Electrones, de la intervención de los Compuestos de Alta Energía tales como ATP y Coenzima A, Reacciones de Fermentación y Fosforilación, Glucolisis, Respiración Aerobia y Anaerobia, Biosíntesis de Aminoácidos, Purinas y Pirimidinas y Biosíntesis de Ácidos Grasos tanto Saturados como Insaturados, con lo que se hace posible el correspondiente crecimiento y multiplicación microbianos.

Consecuencia de las distintas “estructuras” de que dispone la célula, y sobre todo de la adecuada “función” y adaptación al medio, es el correspondiente:

-Crecimiento microbiano-

En microbiología el concepto de crecimiento debe entenderse ^{69,70} como “el incremento del número de células” y dado que, como otros seres vivos, los microorganismos tienen determinado genéticamente su periodo vital, además de estar influidos por las condiciones ambientales, la especie correspondiente podrá mantenerse gracias al incremento ó -crecimiento continuo de la población celular-

proceso en el que cabe considerar tanto las circunstancias intrínsecas del crecimiento, como los factores ambientales que influyen en el mismo.

Se calcula en, al menos, 2000 las reacciones bioquímicas imprescindibles para la multiplicación microbiana que incluyen sobre todo “transformación de la energía, síntesis de moléculas base de las macromoléculas, y fundamentalmente *reacciones de polimerización*, es decir de construcción de polímeros -macromoléculas- a partir de monómeros, seguida de su ensamblaje y de la formación de las distintas estructuras de la célula que finalmente expresará su capacidad funcional merced a la expresión de su DNA, RNA, complejo enzimático, duplicación y fisión binaria, etc.”

El tiempo de generación o de duplicación varía mucho entre los distintos microorganismos y en cada caso se calcula conociendo los números inicial y final de células así como el tiempo que tardan en duplicarse el total de células iniciales, esta circunstancia se nombra como -crecimiento exponencial- y en ella es característico que la velocidad de incremento en el número de células sea lenta al principio y realmente explosiva al final, siendo este crecimiento exponencial resultado de la progresión geométrica del número -2- y el número final de células N:

$$N = N_0 2^n$$

donde N_0 es el número inicial de células, y n el número de generaciones que han tenido lugar durante el periodo de fase exponencial, siendo el tiempo de generación g

$$g = t/n$$

y t las horas ó minutos de crecimiento exponencial.

Asímismo en el crecimiento de las poblaciones microbianas clásicamente se describen -las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte-.

La fase de latencia es el periodo de tiempo, más o menos largo, que media desde que se inocula una población microbiana en un medio nutritivo hasta que comienza su multiplicación. Si el inóculo procede de un cultivo que esté ya en crecimiento exponencial éste se mantiene como tal en el nuevo cultivo sin mediar fase de latencia, la cual se debe a la puesta en marcha de las correspondientes enzimas y reacciones de síntesis necesarias para la progresiva adaptación al medio, es decir, una inicial sobrevivencia que podrá ir seguida, si todo es favorable, de la correspondiente multiplicación. Se requiere adaptación siempre que los microorganismos cambian de medio, o son dañados por la exposición al calor, radiaciones, antibióticos, tóxicos, etc.

La fase exponencial es consecuencia de que una célula se divida en dos y cada una de estas, a su vez, en otras dos y así sucesivamente. Si bien todos los seres unicelulares crecen exponencialmente, la velocidad de este crecimiento varía de acuerdo con sus características genéticas y sobre todo con las condiciones ambientales tales como la temperatura y composición del medio de cultivo. En general los procariotas crecen más rápidamente que los eucariotas y de éstos, los de pequeño tamaño, crecen más rápidamente que los de mayor dimensión.

La fase estacionaria sobreviene cuando el medio nutritivo no se renueva y como consecuencia, aunque se mantengan muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y los procesos biosintéticos, se frena el crecimiento exponencial produciéndose con esta autorregulación, no obstante, junto a la muerte de muchas células, una discretísima multiplicación que determina que el número de células no descienda bruscamente. Este balance de equilibrio se conoce como -crecimiento críptico- que como tal se mantiene hasta que se agota algún nutriente esencial ó se acumula en el medio algún desecho que resulta inhibitorio. Algunos

gérmenes a medida que logran desarrollar recursos de sobrevivencia los guardan en sus genes, tal es el caso de los genes *-sur-* (*survival*) del *Escherichia coli* que, aunque de algunos de ellos se desconoce su función, se sabe que cuando tienen lugar mutaciones de los mismos el microorganismo muere rápidamente determinando que el cultivo entre en fase estacionaria.

Si a pesar de haber entrado un cultivo en fase estacionaria lo seguimos incubando, muchas células siguen metabólicamente activas pero finalmente entran en la llamada fase de muerte, la cual también se perfila como una función exponencial cuya velocidad es, sin embargo, mucho más lenta que la que se presenta en el crecimiento exponencial.

Para objetivar el crecimiento alcanzado por una población microbiana, se procede a su estimación por “contaje directo” al microscopio de acuerdo con las normas oportunas ó al “contaje de viables”, es decir, al “contaje de colonias” en placa que puede realizarse tras el correspondiente -vertido en placa-, que se utiliza solo si los gérmenes resisten temperaturas de 40°C a 45°C, las cuales presenta el medio de cultivo fundido que se vierte mezclado previamente con un volumen conocido de dilución de gérmenes, ó realizando el contaje por el método de -siembra en superficie- que se efectúa mediante la extensión con varilla de vidrio de 0,1 ml de dicha dilución sobre el medio de cultivo sólido; en ambos casos la muestra, como ya se ha referido, debe estar diluida de forma seriada para que el recuento sea factible.

Debidamente controlados la temperatura, tiempo de incubación y medio de cultivo idóneos para que el método de contaje sea válido, en cada caso el resultado suele expresarse como *número de unidades formadoras de colonias* ó de forma abreviada como -u.f.c.- (ó UFC), y efectivamente este procedimiento, al ser el que arroja la mejor información posible, es el método mas utilizado ya que consigue además una alta sensibilidad.

Asimismo, como la masa celular es proporcional al número de microorganismos presentes en ella, ambos parámetros se pueden estimar, pudiendo conocerse el número de células de un cultivo ó biomasa por medio de la *medida de la turbidez* de ésta, a través de un fotómetro ó espectrofotómetro previa realización de la curva estándar que en cada caso relaciona el contaje directo en placa con la correspondiente turbidez; como la medida de la turbidez es razonablemente precisa, rápida y en la actualidad está automatizada es un método ampliamente utilizado también tanto en la industria alimentaria como en investigación, habiéndose ajustado así precisamente, tal y como se explican en Material y Método, los inóculos que se han empleado para la experimentación en este estudio.

-Efectos de los Factores Ambientales sobre el Crecimiento Microbiano-

Con independencia de las condiciones ideales de laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, interesan conocer los efectos de la influencia de las condiciones ambientales naturales sobre dicho crecimiento en general, así como en los casos particulares ó especiales más destacados^{71,72}.

Los factores ambientales con mayor influencia en la sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos son : -temperatura, pH, y disponibilidad de agua y de oxígeno-.

La temperatura afecta tanto al crecimiento microbiano como a su sobrevivencia. A medida que la temperatura ambiental aumenta⁷³, la energía calorífica estimula las reacciones enzimáticas determinando que el crecimiento celular sea más rápido. Siempre que no varíe mucho la composición del medio de cultivo, existen, para cada tipo de gérmenes, las llamadas *temperaturas cardinales*, es decir, una “temperatura mínima” por debajo de la que no existe crecimiento, una “temperatura

óptima” que determina el crecimiento óptimo, y una “temperatura máxima” que, si se rebasa, anula el crecimiento.

Estas observaciones se relacionan y se explican por el funcionalismo celular, así si la temperatura es demasiado baja se limita el transporte adecuado de nutrientes a través de la membrana, y cuando es extremadamente alta las proteínas, ácidos nucleicos, y otros componentes de la célula se coagulan ó se dañan de forma irreversible impidiéndose, de una u otra forma, el correspondiente crecimiento microbiano.

Por otra parte, y según sean de menor a mayor nivel las correspondientes temperaturas óptimas de crecimiento, se distinguen los llamados gérmenes -psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos-^{74,75} cuya presencia se constata en distintos ecosistemas a los que se han adaptado, siendo para los mesófilos los animales de sangre caliente y los ambientes de latitudes templadas y tropicales los medios donde se han desarrollado.

En el caso de los ambientes fríos, siempre que haya agua líquida, y la hay en pequeñísimas proporciones en el seno del agua congelada, es posible encontrar microorganismos; éstos son menos frecuentes si la temperatura ambiente oscila por las estaciones^{76,77}.

Pero, si bien, el frío limita el crecimiento microbiano, no provoca necesariamente la muerte celular, y ciertos componentes del medio con efecto crioprotector cuando penetran al interior de los gérmenes, gracias a la gran proporción de ácidos grasos *insaturados* de sus membranas, evitan allí la formación de cristales permitiéndoles su sobrevivencia. Estas observaciones de la naturaleza reproducidas en el laboratorio permiten, con la utilización de crioprotectores como el glicerol ó el dimetilsulfóxido, conservar cultivos microbianos a -70 y -196°C .

Asimismo, para soportar las altas temperaturas, que logran los procariotes y no los eucariotes a causa de las alteraciones de porosidad de las membranas de sus orgánulos celulares, los microorganismos hipertermófilos (mas de 80°C), cuentan también con recursos adaptativos en su membrana y a nivel enzimático que se describen en el siguiente apartado sobre la Flora Mineromedicinal.

La relación entre Acidez – Alcalinidad (pH) y el crecimiento microbiano está asimismo claramente establecida, la mayoría de los ambientes naturales tienen un valor de pH -5,9- siendo habituales los organismos con pH óptimo equivalentes.

Los gérmenes acidófilos pueden desarrollarse en medios con pH inferior a 7, en ellos suelen encontrarse hongos así como *Thiobacillus*, *Sulfolobus* y *Thermoplasma* éstos dos últimos de *Archaea* que requieren una gran concentración de hidrogeniones para mantener la estabilidad de su membrana citoplasmática la cual se disuelve si éstos faltan provocando de inmediato la muerte celular.

Cuando los gérmenes presentan un pH óptimo superior a 7, incluso de 10-11, se nombran como alcalófilos, los microorganismos con esta característica suelen encontrarse en suelos muy ricos en carbonatos y/ó en lagos ó aguas bicarbonatadas, casi todos se incluyen en el género *Bacillus* y producen proteasas alcalinas que se emplean en la industria como complemento a la acción de los detergentes.

No obstante, con independencia del pH extracelular, el pH intracelular debe permanecer siempre próximo a la neutralidad para evitar que se destruyan las macromoléculas que actúan en condiciones ácidas ó alcalinas las cuales indiscutiblemente afectan al crecimiento microbiano que pasará a depender de la correspondiente adaptación.

Por su parte, si el agua es el disolvente y envolvente de la vida la Disponibilidad de Agua es otro de los factores imprescindibles para el crecimiento microbiano en la

naturaleza y en experimentación. La -actividad de agua- (a_w) es la razón entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia ó solución y la presión de vapor a la misma temperatura del agua pura, sus valores oscilan entre -0- y -1- salvo en los suelos agrícolas donde dicha actividad toma valores de -0,90- a -1,00- .

La difusión del agua ó “proceso de ósmosis” tiene lugar desde un medio con baja concentración de soluto a otro donde dicha concentración es mas alta. El citoplasma celular suele presentar una concentración de solutos mayor que el medio exterior lo que determina un flujo de agua hacia el interior de la célula que por ello presenta un -balance de agua positivo-.

La -plasmolisis- es el fenómeno contrario y tiene lugar cuando desde los microorganismos fluye agua al exterior porque este medio sea una disolución de sal ó de azúcar que tienen muy baja a_w , dichas soluciones se consideran a estos efectos como si fueran un ambiente seco. La entrada ó la salida de agua deben ser compatibles con la funcionalidad celular, en caso contrario pueden ocasionar la muerte de los microorganismos por estallido ó por saturación de los mismos.

No obstante lo anterior, ciertos gérmes han logrado adaptarse y crecer en medios con baja actividad de agua gracias a la producción de los llamados -solutos compatibles- que son compuestos orgánicos generalmente azúcares, polialcoholes, aminoácidos y aún betaína (un derivado de la glicocola) e ión potasio, éstos últimos tomados del exterior, con los que son capaces de obtener agua del ambiente aunque en éste sea escasa.

Estos solutos, así como el nivel de su concentración determinada genéticamente y mediada por la a_w que el microorganismo lea en su entorno, no deben ser inhibitorios sinó compatibles para la bioquímica celular a fin de asegurar la sobrevivencia/crecimiento en -halofilia-. Esta estrategia es la que permite la

existencia y selección de microorganismos en ciertos terrenos, en el agua del mar, lagos salados, fuentes termales, etc.

En cuanto a la Disponibilidad de Oxígeno para el crecimiento de las células microbianas cabe distinguir, según su necesidad ó tolerancia dos grandes grupos, los gérmenes -aerobios- y los -anaerobios-, grupos que a su vez incluyen distintas subdivisiones según sus apetencias y/o resistencia.

El funcionalismo aerobio supone la capacidad de crecer con tensión de oxígeno total, es decir, al menos a un 21% que es la que se presenta en el aire pudiendo soportar concentraciones mayores. La condición microaerófila supone, en cambio, que los microorganismos utilizan este gas solo cuando su tensión es inferior a la del aire debido, en general, a que su capacidad de respirar es limitada ó a que contienen moléculas ó enzimas sensibles al oxígeno.

Por el contrario, el funcionalismo anaerobio supone la imposibilidad de utilizar el oxígeno como aceptor terminal de electrones, al carecer de sistemas respiratorios estos microorganismos, en este grupo, no obstante, hay organismos que toleran el oxígeno y crecen en su presencia aunque no lo utilicen por lo que se llaman anaerobios aerotolerantes, a diferencia de los anaerobios estrictos ú obligados que mueren en su presencia debido posiblemente a su incapacidad para eliminar algún/os producto/s metabólico/s relacionados con el oxígeno tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (OH^*) que resultan de la actuación de los enzimas flavínicos y carecer de los enzimas con los que cuentan los organismos aerobios capaces de descomponer esos tóxicos.

Las células animales pueden producir formas tóxicas del oxígeno como mecanismo defensivo cuando son invadidas por microorganismos, sin embargo muchos de éstos han desarrollado enzimas capaces de destruirlos tales como “catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa”, entre otros, que los determina como aerobios

facultativos ó no y anaerobios aerotolerantes ó no, a este respecto, cabe asimismo decir, que todas las formas conocidas de superóxido dismutasas contienen un metal como cofactor, sobre todo el manganeso (Mn^{2+}) aunque también el hierro (Fe^{2+}) ó cobre (Cu^{2+}) y zinc (Zn^{2+}) habiéndose aislado en Bacteria, Archaea y Eukarya, y que las formas de vida anaerobia no es defectiva sinó que es la expresión adaptativa a numerosos habitats que por la acción de organismos aeróbios acaban siendo anóxicos tales como el medio intestinal y periodontal, sedimentos acuáticos, fangos de aguas subterráneas, residuales, bolsas de petróleo y otros medios⁷⁸.

Una vez revisado los aspectos básicos ó esenciales de la Biología Microbiana en lo que se refiere a *Estructura-Función-Adaptación* así como el *Crecimiento Microbiano* y los *Factores Ambientales* que lo condicionan, todo lo cual debidamente grabado en los genes y que, merced a la correspondiente replicación del DNA, mediante la división celular pasará a las células hijas para permitir la adecuada sobrevivencia y progreso de los distintos microorganismos, seguidamente pasamos a considerar los aspectos particulares de aquellos que se desarrollan como flora en medios especiales tales como las aguas mineromedicinales.

-Biología y Ecología de la Flora de las Aguas Mineromedicinales

Considerados ya, a título de revisión, los conceptos esenciales de la estructura y de la función de los gérmenes en lo que corresponde a su estudio en el laboratorio, interesa también valorar su presencia y organización en la naturaleza, y más particularmente en las aguas mineromedicinales.

Desde una perspectiva ecológica, los microorganismos forman parte de “comunidades” llamadas ecosistemas en los cuales, por definición, todos sus organismos interaccionan con el medio pudiendo llegar a modificar las características de ese ecosistema.

En los ecosistemas microbianos las células individuales forman -poblaciones-, las poblaciones que se relacionan metabólicamente constituyen agrupaciones llamadas -gremios-, y los conjuntos de gremios que desarrollan procesos fisiológicos complementarios forman las -comunidades microbianas- éstas al interaccionar con comunidades de macroorganismos definen el conjunto del -ecosistema- y al coexistir en un determinado espacio definen lo que se conoce como -habitat- .

Muchos habitat debido a lo extremo de sus condiciones físicas y/o químicas, no permiten la vida de organismos superiores, sin embargo, no es difícil encontrar en ellos microorganismos donde incluso crecen mejor que en otros medios más equilibrados, debido a su capacidad, de determinar precisamente esas características extremas con las que configuran así su -nicho ecológico- idóneo, pudiendo ser estos microambientes favorables muy diversos.

La sobrevivencia y la velocidad de crecimiento de los gérmenes en esos microambientes, una vez que allí se ha logrado la adaptación, está muy relacionada

con la disponibilidad de elementos nutritivos y en ese sentido, si en el medio existen superficies, al acumularse en ellas mejor los nutrientes, los gérmenes sobrevivirán y proliferarán mejor que en medios simplemente hídricos, viéndose además que sobre dichas superficies los gérmenes crecen envueltos en -biofilmes- que los protegen e impiden que se disgreguen. No obstante, el desarrollo de un germen en un medio natural es siempre muy inferior a la velocidad máxima que éste llega a alcanzar en cultivos de laboratorio.

En los habitats acuáticos⁷⁹ generales además de los nutrientes, junto al nivel de luz que permitirá a los microorganismos el fototrofismo que los convierte en -productores primarios-, interesa el nivel de oxígeno, que determinará que esa producción de materia orgánica de la que aquellos son capaces se realice en forma óxica ó anóxica.

Las aguas mineromedicinales son, sin duda, un caso especial de habitats acuático, en ellas se suele encontrar materia orgánica -no organizada- procedente del arrastre de los terrenos, sobre todo carboníferos, por los que éstas discurren y/ó por su acción disolvente de las formaciones fósiles que recorren a nivel subterráneo, todo ello en dependencia, a su vez, de las condiciones particulares de presión, temperatura u otras características particulares de las distintas aguas, no obstante estas “materias húmicas” no son abundantes en las aguas minerales pero sí lo son en las fuentes naturales con residuos vegetales, algas y placton que unidos a los ácidos húmicos y con presencia mucilagínosa se denominan *biogleas*^{80,81}.

La materia orgánica -organizada- de las aguas mineromedicinales constituye la llamada -flora hidromineral- que es siempre saprofita y está condicionada y adaptada a las características fisicoquímicas del agua, perteneciendo los microorganismos de las aguas minerales naturales fundamentalmente, según Leclerc y otros, a los grupos *Pseudomona*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, etc.

Aunque son muy numerosas y variadas las especies de microorganismos que se han podido aislar en las aguas mineromedicinales, están claramente en relación con la correspondiente mineralización, tal y como estudió Cámara Niño, siendo ejemplo, entre otras, de dichas especies:

- Algobacterias verdes ó Clorofíceas (que se consideran algas ó incluso protozoos).
- Conjugatae (también consideradas algas suelen ser filamentosas y de bonitas formas).
- Algas verde-azules ó Cianofíceas (muchas igualmente filamentosas que aportan su coloración al agua).
- Diatomeas ó Bacilariofitos (algas unicelulares con membrana silíceas que pueden reunirse en colonias y que al depositarse determina el -barro de diatomeas- de gran capacidad absorbente).

Más específicas de las aguas mineromedicinales son las siguientes especies de algobacterias^{82,83,84} :

- Sulfobacterias que incluyen al Orden Beggiatoales y Pseudomonales (esquizomicetos filamentosos y no filamentosos capaces de oxidar distintas combinaciones del azufre).
- Ferrobacterias del Orden Clamidobacteriales (forman filamentos o apelotonamientos capaces de fijar el hierro en su protoplasma aunque también viven en aguas no ferruginosas y se inhiben en aguas con cobre).
- Manganobacterias que incluyen el Orden Gallonellabacteriales y Clamidobacteriales (bacterias que se benefician del manganeso y del hierro del agua).
- Halobacterias ó flora Halofita integrada por la Familia Charophíceas, son algas que sobre todo están presentes si la mineralización supera >7 g/L .

- Termobacterias ó flora termófila es la que sobrevive en aguas con temperatura superior a 40° C tales como *Mastigoladus*, los *Leptothrix* y *Oscilatoriaceas* (*Cianoficeas*), entre otras.

Para valorar la importancia que tienen estos microorganismos, capaces de hacer de las aguas mineromedicinales su habitat, interesa referir respecto a las aguas que contienen azufre, que las bacterias presentes en ellas desempeñan una notable función tanto en los procesos oxidativos como en los reductores del mismo; así, los quimiolitotrofos ó bacterias oxidadoras del sulfuro y del azufre producen sulfato, mientras que las bacterias reductoras de éste lo utilizan como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica produciendo sulfuro de hidrógeno.

Dado que el sulfuro es tóxico y capaz de reaccionar también con varios metales, los procesos oxidativos del azufre que llevan a cabo las bacterias del azufre en las aguas, juegan un importante papel en relación con la actividad terapéutica de las mismas y en su significado ecológico.

Asimismo, por lo que corresponde al hierro, también las bacterias presentes en las aguas que lo contienen son capaces de transformar los dos estados oxidados, en los que se encuentra en la naturaleza, tales como la forma ferrosa y la forma férrica, produciendo una notable movilización del hierro desde sus depósitos, y la reducción bacteriana del hierro férrico en ambientes anóxicos.

Las Halobacterias demuestran la capacidad de ciertos organismos para soportar cierta reducción de la “actividad de agua” lo que se expresa como (a_0) la cual en el agua pura es del orden de -1,000-. Los microorganismos son moderadamente halófilos cuando crecen en un medio con un 1-6% de cloruro sódico, discretamente halófilos cuando en el medio hay un 6-15% y halófilos extremos cuando requieren 15-30%.

Los cocos Gram (+) en especial los *Staphylococcus* son microorganismos halotolerantes que utilizan -betaína- como soluto compatible el cual, como ya hemos dicho, es un derivado de la glicocola donde los protones de grupo amino están reemplazados por tres grupos metilo para aumentar su solubilidad. Por su parte, las Cianobacterias y en particular la *Ectothiorhodospira* que habita en aguas bicarbonatadas y lagos salados como especie halófila extrema producen como soluto compatible la -ectoína- que es un derivado del aminoácido prolina.

Desde una perspectiva ecológica no suele haber vida por debajo de 0,700 de “actividad de agua” estando en ese nivel determinados hongos xerófilos. Los gérmenes Halófilos suelen ser referentes en la industria alimentaria y una medida de estabilidad del nivel de mineralización de las aguas hiperminerales.

En cuanto a los microorganismos Termófilos (con crecimiento por encima de 45°C) e hipertermófilos (crecimiento a temperaturas superiores a 80°C) sus enzimas y proteínas difieren poco de las que presentan los mesófilos logrando su estabilidad gracias a -puentes de sal y a un empaquetamiento altamente hidrofóbico de dichas proteínas-. Asimismo, los termófilos cuentan con gran riqueza de ácidos saturados en sus membranas que facilitan los enlaces hidrófobos frente a lo que consiguen los insaturados. Por su parte los Hipertermófilos consiguen su estabilidad gracias a que poseen hidrocarburos de cadena larga en lugar de ácidos grasos.

También cabe destacar que las enzimas que poseen todos estos gérmenes “las extremoenzimas” son proteasas, xilanasas, celulasas, ferredoxinas y pululanases, entre otras, y son biocatalizadores que están siendo investigados cada vez mas para aplicaciones industriales, es por lo que la presencia de estos gérmenes en la naturaleza sirven para constatar no solo estas variantes de la vida sino que además contribuyen al desarrollo biotecnológico.

La flora de las aguas mineromedicinales referida, se considera de gran trascendencia, pues supone un conjunto vivo en intercambio permanente con el medio del cual se beneficia y al que en mayor ó menor grado modifica, necesitándose, para todo ello, la correspondiente adaptación y selección microbiológica, estos dos requerimientos quizá expliquen la dificultad que los gérmenes del agua ordinaria pueden encontrar para sobrevivir en el agua mineromedicinal, y quizá asimismo expliquen la escasa transmisión de enfermedades infecciosas e infectocontagiosas a través de estas aguas en los centros hidrotermales.

-Biología y Ecología de los Gérmenes Patógenos Frecuentes Contaminantes en Instalaciones Crenoterápicas aquí estudiados

Además de la flora autóctona, en las aguas mineromedicinales podemos encontrar otros gérmenes, muchos de ellos de naturaleza patógena, que se aportan a las mismas durante le cura desde la piel y/o mucosas de los bañistas.

A diferencia de lo dispuesto para las piscinas de agua ordinaria, la legislación exime a las aguas mineromedicinales de ser tratadas con desinfectantes químicos dado que se las considera un medicamento que no debe alterarse.

Cuando tras una sesión de baños se realiza un análisis microbiológico del agua cabe encontrar, además de los autóctonos, si los hubiera, cierta proporción de gérmenes banales ó comensales e incluso patógenos aportados por los bañistas.

A continuación se procede a una revisión⁸⁵ de las “características biológicas, la exigencia ecológica y efectos patógenos generales” que presentan los cuatro

gérmenes que se estudian en el trabajo experimental de esta investigación, elegidos de entre los que potencialmente con más frecuencia se podrían aportar, mediante el baño, a las aguas mineromedicinales al formar parte de la flora que coloniza y/o infecta subclínicamente a los bañistas.

-Biología y Ecología de *Staphylococcus aureus* Coagulasa (+)

Los estafilococos forman parte del grupo de bacterias no esporuladas más resistentes de la naturaleza siendo capaces de sobrevivir en ambientes no fisiológicos, incluidas las altas temperaturas, y en substratos hipersalinos, habiendo desarrollado también una gran resistencia a muchos antibióticos, estas características determinan que a pesar de las actuales estrategias de Salud Pública este microorganismo se considere un patógeno de importancia^{86,87}.

Su denominación alude por un lado a que se multiplica en las tres dimensiones del espacio permaneciendo las células próximas entre sí y por ello se acumula formando racimos (σταφιλη) y, en ocasiones, pequeñas cadenas de 4 a 5 individuos con forma redondeada y tamaño de unas 0,5 a 1,7 μm con aspecto mucoso ó pegajoso cuando el microorganismo está encapsulado, y por otro, a su capacidad de producir pigmento de tono cremoso-amarillento a dorado clásico dada la presencia de carotinoides en su citoplasma, todo ello si se incuban en medios sólidos, a temperatura ambiente y a la luz del día, siendo aquel menos apreciable si el crecimiento ha tenido lugar en medios líquidos y en anaerobiosis.

Se presenta en colonias claramente definidas, lisas opacas y convexas de 1 a 3 mm de diámetro con crecimiento en algo menos de 24 horas siendo β -hemolíticas casi todas sus cepas.

Pertenece a la Familia Micrococcaceae en la que junto al *Staphylococcus aureus* existen el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus saprophiticus* de quienes se distingue por ser el primero, además de hemolítico, coagulasa (+), además de por su resistencia a la novobiocina y otros antibióticos.

En cuanto a sus características estructurales y funcionales cabe destacar que el 50% del peso de su “pared celular” es el *peptidoglicano* que como ya se ha referido es un polímero de polisacáridos en cadenas no ramificadas y subunidades de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina que básicamente comparte con otros microorganismos siendo específico del *S. aureus* el polímero con cadena cruzada de pentaglicina. Estos componentes de su estructura desencadenan en los monocitos de sus potenciales huéspedes producción de interleucina 1, reacción de Schwartzman local, atracción de polimorfonucleares, activación del complemento, producción de anticuerpos opsónicos e incluso actividad de tipo endotóxico.

También están presentes en su pared celular ácidos teicoicos, los cuales son polímeros que contienen fósforo que se unen en forma covalente al peptidoglucano de dicha pared ó a lípidos de la membrana. El eje de estos ácidos teicoicos es una secuencia alternante de ribitol-fósforo y el de los ácidos de la membrana es la secuencia glicerol-fósforo con cadena de gentobiosa ó alanina. Asimismo este germen presenta en una capa exterior al peptidoglucano, entre otras, la proteína A capaz de activar el complemento e interaccionar con las IgG.

Desde el punto de vista funcional, el microorganismo dispone y elabora enzimas y toxinas necesarias para su metabolismo y sobrevivencia adaptativa tales como:

- Catalasa la cual está en relación directa con la patogenicidad.
- Coagulasa clásicamente también relacionada con la virulencia aunque en la actualidad no siempre se demuestra.

- Hialuronidasa asimismo discutida como rasgo de patogenicidad pero que le facilita su penetración en los tejidos.
- Betalactamasas que están presentes en la fisiología del germen aún en ausencia de antibióticos.
- Lipasas y otras enzimas
- Toxinas $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ y leucocidina, unas tienen acción enzimática otras son inductores de citocinas con acción hemolítica y necrótica y aún neurotóxica determinantes de intoxicaciones, shocks e infecciones locales, generalizadas, agudas y crónicas dada la capacidad del germen para infectar cualquier tejido de la economía.

En cuanto a su distribución ecológica y epidemiología la resistencia del *S. aureus* permite que se le encuentre fácilmente en muchos medios y de acuerdo con factores estacionales se estima entre un 20% y un 40% de portadores nasofaríngeos⁸⁸ y perineales⁸⁹ desde donde el germen pasará a manos y otros puntos de la piel, de éstos, a su vez, un 60% son portadores intermitentes. La densidad de colonización es de 10^3 a 10^4 microorganismos pudiendo hallarse distintas cepas en el mismo portador.

La higiene de la piel y el control de mucosas de los portadores son los recursos y estrategias para controlar la infección por este microorganismo que puede llegar a ser grave cuando existe compromiso en los mecanismos defensivos de los huéspedes tales como defectos en la quimiotaxis, en la opsonización ó en la capacidad estafilocida de los leucocitos, entre otros.

Con todo, la patología que ocasiona este germen suele manifestarse en la piel y sus faneras donde puede producir foliculitis, forúnculos y ántrax -estafilelocócico-, impetigo, hidradenitis supurada, piodermas e infecciones de heridas todas ellas manifestación de infecciones localizadas, cuya lesión básica es un exudado piógeno, así como las que siguen, las cuales se manifiestan con rash cutáneo difuso,

caso del síndrome estafilocócico de la piel escaldada ó síndrome de Ritter^{90,91,92}, y otras además con afectación sistémica como los síndromes del shock tóxico de niños⁹³ y el shock tóxico no menstrual⁹⁴ y menstrual⁹⁵ que cursan, junto a manifestaciones cutáneas, con fiebre, hipotensión, irritación digestiva, confusión mental, insuficiencia renal y otras complicaciones cuya evolución llega a ser fatal en un número apreciable de casos.

Como en los casos de shock, el paso de la infección estafilocócica al medio interno se expresa en forma de septicemia y endocarditis, meningitis, pericarditis, infecciones pulmonares⁹⁶ y empiema pleural así como osteomielitis, artritis y/o bursitis sépticas y piomiositis⁹⁷.

Tanto las afecciones superficiales, como las que interesan al medio interno, y más aún en este último caso, resultan del desequilibrio entre los determinantes microbianos del estafilococo y la respuesta del huésped lo cual ocasiona la citada patología que puede llegar a ser muy grave.

-Biología y Ecología de *Escherichia coli*

La familia Enterobacteriaceae, a la que pertenece *E. coli*, que es el germen de vida libre mejor estudiado, está integrada por microorganismos ampliamente distribuidos en el medio ambiente así como colonizadores habituales del tracto intestinal de humanos y animales, donde forman parte de la flora normal aún cuando el 99% de dicha flora la constituyen gérmenes anaerobios en su mayoría del género *Bacteroides*^{98,99}.

A su vez, esta familia representa alrededor del 80% de las bacterias gramnegativas que se aíslan en el laboratorio clínico siendo *E.coli* la causa mas frecuente de

algunas de las infecciones más comunes como son las urinarias, bacteriemias, y diarrea bacteriana del viajero, así como neumonías y meningitis neonatal.

En lo que corresponde a su estructura, este germen presenta un cromosoma único que contiene DNA bicatenario localizado en el citoplasma donde hay ribosomas y ausencia de mitocondrias y de retículo endoplásmico. La envoltura celular es multilaminar y contiene doble capa de fosfolípidos y lipopolisacáridos con proteínas dispuestas al azar rodeadas por una capa externa de péptidoglucano, polímero que le otorga, como a otros gérmes, su consistencia rígida¹⁰⁰. De estas capas suelen irradiar flagelos, fimbrias y pili sexuales con los que consigue desplazamiento, adherencia y transferencia de sus caracteres¹⁰¹.

Desde el punto de vista antigénico, *E. coli* comparte con todas las especies de Enterobacteriaceas los antígenos O (somáticos) –los cuales son polisacáridos de los LipoPoliSacáridos de la envoltura LPS-, los antígenos H (flagelares) -con naturaleza de proteínas termolábiles- en contraste con las de los antígenos somáticos, y los antígenos K (capsulares) -polisacáridos y a veces proteínas, polímero del ácido *N*-acetilneuramínico- que suelen ser parcialmente termoestables.

Este germen también presenta los llamados factores de virulencia tales como las “adhesinas y toxinas” que se demuestran no solo en cepas patógenas sino también en las no patógenas, las primeras ligadas a las fimbrias y pili y las segundas en forma de citotoxinas, hemolisinas dependiendo los genes que regulan éstas últimas, además, de la disponibilidad de hierro.

Los “plásmidos” -unidades de DNA no cromosómico con capacidad de autorreplicarse- se consideran también un factor de virulencia, en particular el plásmido R ó de resistencia a los antibióticos, aunque esta circunstancia puede relacionarse con la elaboración de betalactamasas y no con plásmidos.

Las características y recursos de sobrevivencia precedentes hacen que *E. coli* determine los siguientes tipos de infecciones:

-Infecciones entéricas donde el protagonismo lo comparten diferentes cepas del citado microorganismo causantes de efectos enterotoxigénicos cuando de forma superficial se unen las células bacterianas a las del epitelio intestinal tras la ingestión de agua ó alimentos contaminados causando un cuadro diarréico casi apirético, que es la ya citada “diarrea del viajero” ó “cólera infantil” en los lactantes; efectos enteropatógenos con fiebre, malestar, vómitos y diarrea, sobre todo mucosa, en lactantes; efectos enterohemorrágicos secundarios a la acción de la llamada Verotoxina (toxina activa para las células Hela y Vero) capaz de afectar a los endotelios vasculares asociandose la presencia del *E. coli* con cuadros de colitis ulcerosa y síndrome urémico hemolítico, así como con intoxicaciones alimentarias a partir de carnes de vacuno, aves, cordero ó cerdo; efectos de enteroadherencia con un patrón de apilamiento de bacterias como las encontradas en niños con diarrea crónica; y efectos enteroinvasivos al penetrar las bacterias en las células epiteliales en las que prolifera causando diarrea seromucosa semejante a las debida a *Shigella* todo ello a partir de la capacidad del germen para interaccionar con la mucosa intestinal, elaborar toxinas u otros factores de virulencia codificados por plásmidos^{102 a 105}.

-Infecciones urinarias^{106 a 108} las cuales son el punto de infección mas común del *E. coli*, así como el tracto gastrointestinal son su medio de colonización normal. Los efectos de esta infección pueden ser desde una uretritis no complicada hasta una cistitis sintomática y recidivante, ó una pielonefritis y hasta una sépsis todo ello relacionado con anomalías de vías urinarias, sondajes y fístulas enterourológicas entre otras exposiciones así como inmunodepresiones etc., siendo la mayor parte de la infecciones urinarias secundarias a un número pequeño de tipos O tales como O4, O6, O75²²².

-Infecciones respiratorias que a diferencia de las anteriores suelen ser oportunistas a partir de la diseminación hematógena, ó mas frecuentemente por microaspiración de secreciones de vías respiratorias superiores previamente colonizadas por *E. coli* u otros gramnegativos, e incluso por la diseminación faríngea retrógrada desde el estómago que con frecuencia suele estar colonizado cuando existe stress orgánico severo determinante del descenso de fibronectina -proteína de cubierta de las mucosas y receptora de grampositivos- lo cual deja así vulnerable el aparato respiratorio a la vez que un vacío ecológico que enseguida rellenan los gramnegativos causando así estas infecciones que suelen ser mas nosocomiales que adquiridas en la comunidad en la que los pacientes suelen ser enfermos de diabetes, alcoholismo ó EPOC.

-Meningitis neonatal¹⁰⁹, el *E. coli* y los estreptococos del grupo B son las causas más frecuentes de meningitis durante el primer mes de vida sobre todo asociada a la presencia del antígeno capsular K1 mas que con la bacteriemia por dicha enterobacteria ya que durante el embarazo aumenta la colonización digestiva, y posterior diseminación mucosa, de cepas K1.

No obstante lo anterior, aunque la colonización de las superficies mucosas por *E. coli* es frecuente, la bacteriemia por invasión del tracto gastrointestinal normal suele ser rara gracias al sistema de filtración normal en la circulación portal sin embargo es frecuente cuando la infección reside en vías urinarias y, como en el caso de la meningitis, el antígeno K1 se correlaciona con la resistencia al suero. Por otra parte, la infección por contigüidad en zonas distales se relaciona con la frecuente patología vascular de los diabéticos. En otros niveles el *E. coli* puede ocasionar endoftalmitis, sinusitis, tiroiditis supurada, abscesos hepáticos, intraabdominales y cerebrales, osteomielitis, prostatitis y tromboflebitis séptica y otras afecciones.

Por otra parte, los mecanismos de defensa, la higiene general y la nutrición adecuada de las personas sanas evitan normalmente el riesgo de infección frente a *E. coli* germen con demostrada y gran ubicuidad.

-Biología y Ecología de *Pseudomona aeruginosa*

Perteneciente a la familia Pseudomonadaceae^{110,111}, la *Pseudomona aeruginosa* es un germen gramnegativo que se desarrolla exclusivamente en condiciones aerobias (salvo en presencia de nitrato) y no fermenta los carbohidratos, es móvil, posee un flagelo monotrico polar, es un bacilo con un promedio de 0,5 a 0,8 x 1,5 a 3 mμ, recto ó ligeramente curvo, no esporulado que se muestra aislado, apareado ó formando cadenas cortas.

Sus requerimientos nutricionales son versátiles, se desarrolla de manera óptima de 37°C y hasta unos 42°C. La oxidación de los distintos azúcares, entre otras pruebas, permite diferenciar a *P. aeruginosa* de otras especies de *Pseudomonas* siendo específico de ésta la producción de una fenazina soluble llamada piocianina, pigmento fluorescente azul ó verdoso, al que se refiere el término *aeruginosa* y asimismo la presencia de un olor dulzón allí donde el germen se desarrolla.

En cuanto a su distribución en el ambiente, puede afirmarse categóricamente que este microorganismo es cosmopolita estando presente en suelos, aguas, animales y plantas y con capacidad de adaptación a condiciones físicas inusuales y bajo nivel de nutrientes (sobrevive en agua destilada).

Su habitat natural son los ambientes húmedos con o sin relación con las plantas. La colonización humana está también en relación con dicha higrofilia ubicándose en periné, axilas e incluso oídos¹¹²; en los medios hospitalarios forma reservorios en los equipos respiratorios, y de limpieza, precesadoras de alimentos, servicios de

aseo, agua de los jarrones de plantas ornamentales, etc.; en el medio comunitario, los sistemas jacuzzis, piscinas ordinarias y servicios públicos de aseo son, entre otros, los medios donde es fácil encontrarlas.

Es un saprofito humano frecuente y forma parte de la flora microbiana humana normal, no obstante la prevalencia de colonización de personas sanas es reducida al contrario que la de personas hospitalizadas sobre todo los quemados, los pacientes con ventilación mecánica, los tratados con quimioterapia, etc., en quienes la *Pseudomona aeruginosa* suele proliferar de forma muy amenazante en piel, en aparato respiratorio y en tubo digestivo respectivamente precediendo a la infección franca por todo lo cual es preciso su absoluto control tanto en el medio comunitario como en el hospitalario donde es la causa más frecuente de neumonías, de infecciones urinarias y de infección de las heridas quirúrgicas.

Siendo un patógeno oportunista¹¹³ no suele provocar enfermedad en personas sanas, por otro lado cuando tiene lugar la infección por este germen suele ser de carácter multifactorial y complejo ya que la *Pseudomona aeruginosa* actúa como microorganismo invasor y toxigénico siendo necesarios todos los pasos de la siguiente secuencia:

1. Fijación y colonización bacterianas
2. Invasión local
3. Diseminación y enfermedad sistémica

Aunque el proceso patológico puede interrumpirse en cualquiera de dichas fases por el tratamiento o por los mecanismos defensivos naturales del huésped y su consiguiente recuperación.

Los *pili* ó *fimbrías* de las pseudomonas tienen una alta correlación con la adherencia y colonización bacteriana de las células epiteliales respiratorias y de otras superficies a pesar de la protección inicial de la fibronectina que se pierde por

el deterioro del paciente ó un nivel de proteasa elevado en las secreciones respiratorias. Asimismo, la adherencia de estos gérmenes es mayor cuando las células están deterioradas que si están íntegras tanto en vías respiratorias como en aparato urinario etc.

La *P. aeruginosa*, también puede producir -glucocáliz- o exopolisacárido mucoide, que es una cápsula compuesta de ácidos manurónico y glucurónico en estructura repetida llamada *alginato* y que es capaz de anclar el germen al medio y/o a otras bacterias, protegiéndolas de los factores inmunes del huésped y formando una *biopelícula* de crecimiento comunitario de bacterias fijadas y protegidas de la fagocitosis y otras defensas del huesped, e incluso de los antibióticos gracias al alginato.

Junto a la acción necrosante en general de la proteasa y de la elastasa que también produce la *P. aeruginosa*, ésta última enzima se asocia con hemorragias por las lesiones vasculares que ocasiona. La *citotoxina* también llamada *leucocidina* por actuar sobre los polimorfonucleares contribuye también a las lesiones pulmonares cuando se localiza allí la infección.

Dos hemolisinas, la *fosfolipasa C*⁵⁹ y un ramnolípido contribuyen a la invasividad de la bacteria y además actúan degradando enzimáticamente el surfactante pulmonar. La *piocianina*, enzima característica, suprime el desarrollo de otras bacterias, elimina la actividad de los cilios respiratorios y produce daños oxidativos en los tejidos muy oxigenados tales como el pulmón.

La *exotoxina A* y la *exoenzima S* inhiben la síntesis proteica y además la primera anula la respuesta macrofágica y la *Enterotoxina* altera la funcionalidad gastrointestinal ocasionando diarrea.

La dotación enzimática y las características ecológicas de *Pseudomona aeruginosa*, aún siendo un germen saprofita, puede condicionar cuando infecta, los siguientes procesos clínicos^{114 a 121} según orden alfabético:

- Bacteriemia, que por lo común se observa en pacientes inmunocomprometidos.
- Endocarditis en portadores de prótesis de válvulas cardíacas y en usuarios de drogas endovenosas.
- Fibrosis Quística del tracto respiratorio inferior por su colonización con cepas mucoides formadoras de biopelícula y alginato.
- Infección Gastrointestinal, muchas veces subclínica, comienza en orofaringe y luego se extiende a otros tramos ó a todo el tubo digestivo afectando, sobre todo, a personas inmunocomprometidas.
- Infección Ocular, no poco frecuente y relacionada casi siempre con peculiaridades anatomofisiológicas de los ojos que se manifiesta con ocasión de un traumatismo, como una blefarokonjuntivitis, queratitis, absceso escleral ó celulitis orbitaria, siendo también frecuente etiología de la oftalmía neonatal.
- Infección Ósea y articular, se relaciona con diseminación hematogena del germen a partir de infecciones urinarias, consumo por adicción a drogas endovenosas, siendo mayor el riesgo si existe artritis reumatoidea, heridas punzantes en niños en crecimiento, etc.
- Infección Ótica, que determina el “oído de nadador” cuando es externa la cual se denomina maligna cuando se convierte en invasora y necrosante que suele presentarse en diabéticos ancianos ó en sujetos inmunodeprimidos aunque también a niños no sanos.
- Infección de la Piel y Tejidos Blandos, que tiene lugar como diseminación de un foco primario o una bacteriemia, son localizadas o difusas y se ubican, sobre todo, en áreas previamente traumatizadas e incluso exacerban lesiones de acné.

- Infección respiratoria, cuando afecta a su tramo inferior suele coincidir con situaciones de inmunocompromiso y/o enfermedad pulmonar crónica a partir en muchos casos de aspiración de pseudomonas que colonizaban la faringe y tracto superior, los reservorios hospitalarios del microorganismo facilitan la aerosolización directa siendo, en cualquiera de estos casos, la neumonía es grave. También se asocia la infección pulmonar crónica por *P. Aeruginosa* con bronquiectasias.
- Infección del Sistema Nervioso Central, cuando tiene lugar, suele provocar meningitis y abscesos cerebrales y son consecuencia de expansión de un foco contiguo ótico, mastoideo ó de senos paranasales; también por traumatismo ó intervención craneal e incluso por diseminación lejana desde el tracto urinario otros focos, siendo todo ello relativamente frecuente también en personas inmunocomprometidas o con otras patologías crónicas.
- Infección Urinaria, la cual suele estar relacionada con sondaje vesical, por formación de “biopelícula” o intervenciones en el trato urinario aunque también aparece en mujeres a partir de reservorios vaginales y en niños, donde se presenta como la quinta causa mas frecuente de infección urinaria recurrente en la edad escolar. A nivel renal la invasión de los vasos sanguíneos pequeños por *P. Aeruginosa* ocasiona infartos múltiples en dichos órganos.

A la vista de todo lo anterior cabe decir que la presencia ubicua de este germen saprofito requiere medidas de control, dado su efecto en personas con compromiso de su salud susceptibles de ser colonizadas y sobre todo infectadas por dicho microorganismo.

-Biología y Ecología de *Legionella pneumophila* SG 1

La familia Legionellaceae¹²² abarca más de 40 especies que incluyen al menos 50 serogrupos, en ella, *Legionella pneumophila* es responsable de casi el 90% de las infecciones que estos gérmenes pueden ocasionar e incluye, a su vez, 14 serogrupos siendo los nombrados con el número 1, 4 y 6 los más implicados en la infección humana (75%).

Se presentan como bacilos gramnegativos carentes de cápsula y no formadores de esporas, cuya morfología cambia a cocobacilos delgados en las muestras clínicas y a bacilos filamentosos cuando proceden de cultivos en cuyo caso alcanzan 0,3 µm a 0,9 µm de ancho y 1,5 a 2 µm de longitud aunque pueden llegar a 20 µm en algunos cultivos. Casi todas las especies poseen flagelos polares y subpolares que les permiten suficiente movilidad.

En relación con su cultivo, todas las especies son nutricionalmente muy exigentes lo que contrasta con su fácil crecimiento en el ambiente natural aunque en éste casi nunca se presenta en forma libre sinó en simbiosis con otros microorganismos. Generalmente se inhibe en presencia de otros gérmenes por lo que los medios para su crecimiento en laboratorio deben enriquecerse con L-cisteína y sales de hierro que es lo que contiene el BCYE-α (buffered charcoal yeast extract -alfa ketoglutaric acid), medio donde crece tras 4 a 7 días de incubación 35° a 37°C con aporte de humedad mostrándose en colonias grisáceas y brillantes.

La pared de estas bacterias contiene una proporción muy elevada de ácidos grasos de cadena ramificada y no ramificada cuyo perfil cromatográfico es útil para su identificación, asimismo, en su membrana abundan proteínas y lipopolisacáridos determinantes del antígeno soluble de superficie que permite la detección del germen en las muestras por inmunofluorescencia directa, así como la prueba de antigenuria y la elaboración de anticuerpos frente a dicho antígeno, detectable por

inmunofluorescencia indirecta en las personas infectadas. La mayoría de las especies de *Legionella* son debilmente positivas para la catalasa y peroxidasa, mientras que la hidrólisis del hipurato de sodio es positiva solamente casi para la *Legionella pneumophila* que es la que protagoniza la mayoría de los brotes epidémicos debidos a la familia Legionellaceae.

Las bacterias de esta familia son ubicuas tanto en el ambiente natural como en el comunitario aislándose de cursos de agua de todo el mundo. Proliferan en puntos de estancamiento de agua tanto en la naturaleza como en los del medio comunitario que se constituyen su reservorio; no obstante para dicha multiplicación tiene que asociarse con algas de agua dulce que son a su vez fagocitadas por amebas de vida libre como las *Acanthamoebas*, *Naegleria* y *Hartmanella* o por protozoos ciliados, *Tetrahymenea*, entre otros, donde se acantona como parásito intracelular hasta que se multiplica y destruye al huesped que libera así multitud de nuevas legionellas móviles que repetirán el ciclo, siendo esta misma secuencia la base de la patogenia en humanos cuando alcanza, tras la infección, el sistema monocito/macrófago. Cuando las condiciones ambientales son adversas la ameba se enquista protegiendo así a la bacteria incluso de los desinfectantes^{123 a 126}.

La mayoría de las Legionellas y en particular *Legionella pneumophila* sobreviven en un amplio rango de condiciones ambientales tales como aguas de 0° a 63°C con pH de 5.0 a 8.5 y oxígeno disuelto entre 0.2 y 15.0 mg/l, siendo la temperatura más favorable para su multiplicación el intervalo 30° a 45°C.

Los brotes epidémicos suelen estar relacionados con las aguas de los reservorios artificiales donde la concentración de legionelas llega a ser muy superior a la que se alcanza en los reservorios y cursos naturales pues, cuando se queda estancada el agua cierto tiempo a temperaturas favorables en los depósitos comunitarios ó en la red de tuberías, se facilita su crecimiento y proliferación¹²⁷.

La transmisión^{128,129} de la *Legionella* desde sus fuentes/reservorios hasta el ser humano se considera que puede tener lugar mediante tres mecanismos la -aerosolización aspiración e instilación- no habiéndose comunicado que la enfermedad se transmita persona-persona, es decir, que los enfermos de legionelosis no se constituyen fuentes de contagio de esta enfermedad para otras personas, ni aún familiares.

En efecto, la *Legionella pneumophila* puede inhalarse a través de microgotas y sobre todo si son inferiores a 0,5 μ m verdaderos aerosoles que se generan en muchos procesos industriales, en la refrigeración, y en el uso de duchas y otras instalaciones hidroterápicas a las que puedan llegar aguas contaminadas con dicho germen.

Respecto a la aspiración de agua, asimismo contaminada, y sobre todo la autoaspiración de este microorganismo a partir de las propias secreciones faríngeas tras la correspondiente colonización de este tramo del aparato respiratorio, es un mecanismo razonado como una posibilidad teórica no bien documentada pero, para muchos autores, posiblemente el mayor modo de transmisión capaz de explicar los casos que aparecen en relación con cirugías ó sin presencia demostrada del germen en el ambiente.

Por último, el aporte directo de este germen a vías respiratorias por medio de intubaciones, lavados nasofaríngeos, aerosolizaciones, etc. realizados con agua contaminada determina el mecanismo de instilación.

La patogenicidad en el caso de la *Legionella pneumophila*, y algunas otras especies, radica en una proteína de superficie de 24 kDa que por su efecto potenciador de la infectividad a los macrófagos se denomina MIP la cual es capaz de inhibir la actividad de la proteína-quinasa C, asimismo el germen cuenta con otras moléculas potencialmente implicadas en su capacidad patogénica tales como una proteína con

propiedades de metaloproteasa, una legiolisina con actividad hemolítica, una fosfolipasa C y el lipopolisacárido que, como ya hemos dicho, es determinante del antígeno soluble de superficie y se relaciona con la actividad endotóxica^{130,131}.

La clínica^{132,133} dependiente, tras la infección por *L. pneumophila* del Serogrupo 1, puede adoptar una forma pulmonar ó Enfermedad de los Legionarios, que se expresa con neumonía, o la forma de Fiebre de Pontiac que es un proceso sin neumonía, autolimitado y benigno que lo ocasiona tanto la *L. pneumophila* serogrupos 1 y 6 como las *L. feeleii*, *L. micdadei* y *L. anisa*.

La forma neumónica debuta tras un periodo de 2 a 10 días con anorexia, astenia, artromialgias y malestar general y, sobre todo, con hipertermia de 38 a 40°C acompañada de bradicardia en personas mayores; la irritación de vías respiratorias altas es escasa y la tos poco productiva en contraste con el dolor torácico pleurítico ó no y la disnea, en muchos casos. Junto a los síntomas respiratorios frecuentemente aparecen nauseas, vómitos, dolor abdominal, diarreas e incluso síntomas neurológicos como cefaleas, confusión mental e incluso encefalopatías.

La Fiebre de Pontiac, a diferencia de la anterior, tras una incubación de 24 a 48 horas se presenta como un cuadro gripal con fiebre, escalofrios, artromialgias, tos e irritación digestiva que se resuelve espontaneamente tras 2 a 5 días sin tratamiento demostrándose una ligera leucocitosis con neutrofilia y la elevación de los correspondientes anticuerpos.

Asimismo, el concepto de Legionelosis incluye la Forma Neumónica, la Fiebre de Pontiac así como la Infección Extrapulmonar por cualquier miembro de la familia Legionellaceae.

Aunque cuando se identificó como causa de la Enfermedad de los Legionarios, y en epidemias cercanas a dicho brote la letalidad estuvo cerca del 20%, en la actualidad

las estrategias de prevención secundaria la han hecho descender situándola entre un 8 y un 15% en el peor de los casos. No se conoce bien su incidencia porque hasta ahora no se la ha buscado como causa de las neumonías adquiridas en la comunidad, sin embargo gracias a que en la actualidad se dispone de sencillos medios diagnósticos para la determinación del antígeno soluble en orina de posibles afectados y pruebas de inmunoensayo realizables “*in situ*” para el rastreo del germen en agua, este proceso puede caracterizarse mejor.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Fue en la década de los años 60 cuando disposiciones oficiales de rango nacional determinaron que se incluyera la cloración en el servicio municipal de abastecimiento de aguas a la comunidad, todo ello a fin de controlar potenciales epidemias debidas a gérmenes de transmisión hídrica.

Esta estrategia de Salud Pública es un recurso de probada eficacia frente a la mayoría de los microorganismos patógenos causantes de dichas epidemias, siempre que en el agua la concentración de cloro libre residual se mantenga en el intervalo de desinfección, el cual a su vez debe ser bien tolerado a nivel orgánico tanto para el agua de bebida como en usos externos, particularmente, en piscinas públicas.

Como excepción, las aguas mineromedicinales, a fin de preservar sus características, no han de atenerse a dicha cloración, dado además la constante ausencia de datos, tanto en las antes obligadas memorias hidrológicas, como en la actualidad, sobre la circunstancia de que los Balnearios sean focos de epidemias holomianticas clásicas debidas a bacterias patógenas de transmisión a través del agua de sus piscinas.

Para tratar de explicar dicha observación consideramos como HIPÓTESIS:

- 1) Que a pesar de, y/o debido a los diversos elementos mineralizantes que contienen las aguas mineromedicinales, la constancia en su concentración, las características físicas y químicas, y el equilibrio entre sus componentes, estas aguas no favorecen el desarrollo de los gérmenes con el nivel de vegetatividad que éstos alcanzan en un medio nutritivo general de laboratorio.

- 2) Que la vegetatividad, es decir, la multiplicación y/o sobrevivencia de dichos gérmenes en las aguas mineromedicinales, podría ser equivalente ó próxima a la que tiene lugar en el agua clorada, e incluso la composición mineromedicinal podría, igualmente determinar cambios enzimáticos en los microorganismos que lleguen a ella, así como incluso tendencia a su inhibición, todo ello en forma comparable a los efectos que tiene sobre los gérmenes el agua clorada en niveles de potabilización, y asimismo a los efectos de la carencia total de elementos como los que ocasiona la exposición prolongada al agua destilada.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general.–

Estudiar aspectos de la vegetatividad de gérmenes patógenos inoculados experimentalmente en diferentes aguas mineromedicinales y de control, y valorar la calidad microbiológica de las aguas del manantial e instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange.

Objetivos Específicos.–

- 1º Cuantificar y comparar mediante las correspondientes curvas de crecimiento-letalidad, la posible sobrevivencia, multiplicación ó inhibición microbiana de gérmenes patógenos, elegidos de entre los microorganismos contaminantes más frecuentes en instalaciones balnearias, una vez inoculados éstos simultaneamente, tanto en las diferentes aguas utilizadas en este estudio, como en un medio nutritivo idóneo para su crecimiento natural, en agua destilada y en agua de la red de abastecimiento con nivel clorométrico de potabilización.

- 2º Determinar y comparar con el perfil enzimático inicial de los gérmenes inoculados en el caldo nutritivo, los posibles cambios que pudieran darse en las enzimas, y/o en la inmunofluorescencia, cuando dichos gérmenes se inoculan en las distintas aguas mineromedicinales, de acuerdo con el tiempo de exposición ó contacto.

- 3º Proceder a la comparación entre el recuento e identificación de los gérmenes que pudieran hallarse en el agua naciente y en la ya utilizada en las piscinas del Balneario de Alange, por el método de filtración de membrana *in situ*, y los resultados que se obtengan tras la siembra sistemática en el laboratorio, de una muestra idéntica tomada simultáneamente de los puntos citados.

- 4º Aportar resultados que contribuyan a orientar soluciones en el debate sobre la vigilancia y tratamiento higiénico de las instalaciones termales en relación con la atención de Salud Pública.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Para tratar de contestar la hipótesis y los objetivos de este estudio, se han consultado los protocolos ya establecidos para la investigación de laboratorio y de campo, tanto en microbiología como en hidrología médica, que se exponen a continuación^{134,135}.

También procedemos a describir, como un apartado especial dentro del -material y métodos-, una reseña técnica sobre la Historia, Características del Agua, Indicaciones, Instalaciones y Servicios del Balneario de Alange cuyas aguas -oligometálicas radioactivas- se han utilizado, tanto para el estudio experimental de laboratorio sobre la vegetatividad microbiana en aguas radiactivas, como para el estudio de campo sobre dicha vegetatividad, efectuándose esta última valoración por medio de la siembra directa y de la filtración por membrana del agua naciente y de la ya servida de dicho Balneario.

□ **Protocolo de Microbiología**

*Material de Estudio para la contaminación experimental

El material para trabajar sobre la hipótesis y objetivos del estudio, como puede deducirse de ellos, ha sido necesariamente microorganismos y aguas mineromedicinales, ordinaria y destilada, cuya elección se ha sometido a los oportunos criterios de factibilidad e interés hidrológico y científico.

-Criterios de Inclusión-

Para el estudio de los aspectos vegetativos de los microorganismos en aguas mineromedicinales, se han elegido gérmenes representativos de los que con más frecuencia pueden aportarse por balneación a las aguas, al colonizar y/o infectar habitualmente órganos y sistemas tales como piel, aparato respiratorio, tubo digestivo y sistema genitourinario.

a) Microorganismos:

Se ha experimentado con gérmenes de ATCC (American Type Collection Culture) y con los mismos obtenidos de Aislados Clínicos para valorar las posibles diferencias en la correspondiente vegetatividad tras la exposición a las distintas aguas, habiéndose incluido en el estudio experimental:

- *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico.
(como potencial infectante de piel y mucosas).
- *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico.
(como potencial infectante de tubo digestivo, mucosa recto-anal y genitourinaria).
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico.
(como potencial infectante del aparato genitourinario).
- *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia.
(como potencial infectante del aparato respiratorio).

Estos microorganismos han sido cedidos para el estudio por el Departamento de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid y por el Centro de

Microbiología de Majadahonda correspondiente al Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo.

b) Aguas Mineromedicinales :

Las aguas mineromedicinales que se han utilizado asimismo en el estudio experimental se eligieron de entre las que mantienen su equilibrio mineral estable cierto tiempo (el imprescindible para el transporte y trabajo de laboratorio ha sido tres días en cada caso), pudiendo incluso ser envasadas para así disponer de ellas con facilidad. De acuerdo con los tres apartados de la clasificación según la mineralización global de aquellas^{136,137}, la investigación incluye:

- 1.- De entre las <aguas minerales con más de 1g/L de sustancias mineralizantes> una muestra de las que se distribuyen embotelladas, habiéndose elegido de este grupo las siguientes aguas:

- Agua Mineromedicinal Sulfatada Sódica Hipertónica.

- Agua Mineromedicinal Bicarbonatada Sódica / Carbogaseosa.

- 2.- De entre las <aguas minerales con elementos mineralizantes especiales> se ha elegido:

- Agua Mineromedicinal Radiactiva.

- (utilizada también en el estudio de campo)

- 3.- De entre las <aguas oligometálicas ó indeterminadas> se ha elegido como muestra una de entre las que se distribuyen embotelladas:

- Agua Mineromedicinal Oligomineral Bicarbonatada mixta.

La composición de las aguas, antes citadas, utilizadas en la experimentación es:

-Agua Sulfatada Sódica Hipertónica:

Residuo seco a 180°C: 86.550 mg/L

Dureza Total: 341°F

| | | |
|----------|-------------------------------|---------------|
| Aniones: | Cl ⁻ | 2.493,0 mg/L |
| | HCO ₃ ⁻ | 341,6 mg/L |
| | F ⁻ | 0,9 mg/L |
| | CO ₃ ⁼ | 24,0 mg/L |
| | SH ⁻ | 19,1 mg/L |
| | SO ₄ ⁼ | 54.980,0 mg/L |

| | | |
|-----------|------------------|---------------|
| Cationes: | Li ⁺ | 1,1 mg/L |
| | K ⁺ | 27,8 mg/L |
| | Mg ⁺⁺ | 522,1 mg/L |
| | Na ⁺⁺ | 26.882,0 mg/L |
| | Ca ⁺⁺ | 504,7 mg/L |

-Agua Bicarbonatada Sódica:

Residuo seco a 180°C: 192 mg/L

| | | |
|----------|------------------------------|-----------|
| Aniones: | Cl ⁻ | 16,0 mg/L |
| | F ⁻ | 0,5 mg/L |
| | SO ₄ ⁼ | 1,5 mg/L |

| | | |
|-----------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | HCO_3^- | 164,2 mg/L |
| Cationes: | Na^{++} | 52,1 mg/L |
| | K^+ | 5,4 mg/L |
| | Ca^{++} | 8,1 mg/L |
| | Mg^{++} | 6,1 mg/L |
| -Agua Carbogaseosa: | | |
| Residuo seco a 180°C: | | 673,0 mg/L |
| Conductividad: | | 1223 $\mu\text{S}/\text{cm}$ |
| pH: | | 6,03 |
| Aniones: | Cl^- | 64,51 mg/L |
| | F^- | 0,56 mg/L |
| | SH^- | <0,10mg/L |
| | $\text{SO}_4^{=}$ | 15,00 mg/L |
| | CO_2 | 23,20 mg/L |
| | HCO_3^- | 337,30mg/L |
| Cationes: | Na^{++} | 234,500 mg/L |
| | K^+ | 25,900 mg/L |
| | Ca^{++} | 58,600 mg/L |
| | Mg^{++} | 10,250 mg/L |
| | Mn^{++} | 0,092 mg/L |
| | Fe^{++} (en disolución) | 2,030 mg/L |
| | Cu^{++} | 0,117 mg/L |

-Agua Oligomineral Bicarbonatada Mixta:

Residuo seco a 180°C: 259.0 mg/L

| | | |
|----------|-------------------------------|------------|
| Aniones: | Cl ⁻ | 7.6 mg/L |
| | F ⁻ | 0.1 mg/L |
| | SO ₄ ⁼ | 19.3 mg/L |
| | HCO ₃ ⁻ | 277.8 mg/L |

| | | |
|-----------|------------------|-----------|
| Cationes: | Na ⁺⁺ | 5.1 mg/L |
| | K ⁺ | 1.0 mg/L |
| | Ca ⁺⁺ | 60.1 mg/L |
| | Mg ⁺⁺ | 25.3 mg/L |
| | SiO ₂ | 7.2 mg/L |

-Agua Radiactiva del Balneario de Alange:

(el agua radiactiva utilizada en la experimentación se ha obtenido del Manantial del Balneario de Alange)

Conductividad a 25°C: 224 μS

Residuo seco a 180°C: 124.4 mg/L

Alcalinidad: 20 mg/L

Dureza: 51.8 mg/L

pH: 6

rH: 29.35

| | | |
|----------|-------------------------------|------------|
| Aniones: | Cl ⁻ | 46.75 mg/L |
| | F ⁻ | 0.17 mg/L |
| | NO ₃ ⁻ | 10.53 mg/L |
| | SO ₄ ⁼ | 9.93 mg/L |
| | CO ₂ | 50,50 mg/L |
| | HCO ₃ ⁻ | 24.40 mg/L |

Cationes:

| | | |
|--|------------------|------------|
| | Na ⁺⁺ | 18.21 mg/L |
| | K ⁺ | 5.77 mg/L |
| | Ca ⁺⁺ | 10.39 mg/L |
| | Mg ⁺⁺ | 6.27 mg/L |

Nivel de radiactividad:

(en muestras de agua):

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Actividad debida a ²³⁸ U | 1,5 ± 0,1 mBq/L |
| Actividad debida a ²³⁴ U | 1,7 ± 0,1 mBq/L |
| Actividad debida a ²¹⁰ Po | 19,5 ± 1,0 mBq/L |
| Actividad debida a ²¹⁰ Pb | 78,5 ± 5,8 mBq/L |

Concentración de ²²⁶Ra disuelto < 20 mBq/L

Concentración de ²²⁴Ra disuelto < 20 mBq/L

Concentración de ²²²Rn disuelto 240 Bq/L

(en muestras de aire):

| | |
|--|------------------------|
| Concentración de ²²² Rn en patios abiertos | 20 Bq/m ³ |
| Concentración de ²²² Rn en sala de inhalaciones | 60 Bq/m ³ |
| Concentración de ²²² Rn en recinto de lagunas de baño | 80 Bq/m ³ |
| Concentración de ²²² Rn en recinto de termas romanas | 1100 Bq/m ³ |

c) Agua ordinaria de la red de abastecimiento:

El agua ordinaria de la red empleada en el estudio es la distribuida en Madrid por el Canal de Isabel II, la cual en todos los casos se ha dejado fluir hasta comprobar que alcanzaba un nivel de cloro libre residual dentro del intervalo - 0,2 a 0,4 - p.p.m. ó mg/L exigido en la potabilización sanitaria¹³⁸ y que efectivamente es el que presentó el agua durante el estudio. Los resultados de la contaminación experimental del agua de la red con los gérmenes del estudio, se han tomado como CONTROL frente a los de dicha contaminación de las aguas mineromedicinales, ya que en el agua de la red por la presencia del cloro cabe esperar la inhibición de los gérmenes.

d) Agua destilada:

El agua destilada y estéril que se ha empleado para las diluciones, una vez contaminada con los gérmenes del estudio, la hemos considerado también CONTROL frente a los resultados de la contaminación microbiana experimental de las aguas mineromedicinales y del agua de la red, dado el efecto inicialmente neutro frente a la multiplicación-inhibición que tiene sobre los gérmenes el agua destilada, y su efecto lítico tras un contacto prolongado¹³⁹.

-Instrumental — Medios de Cultivo — Reactivos-

Los aparatos e instrumentos utilizados para esta investigación han sido los disponibles en el Laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (U.C.M.), y del Hospital Clínico de San Carlos de dicha Facultad, junto a los disponibles en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos III del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo también de Madrid, así como los disponibles en el laboratorio de la Cátedra de Hidrología Médica del Departamento de “Medicina Física y Rehabilitación. Hidrología Médica” de la, antes citada, U.C.M., y fueron:

Para el estudio microbiológico en el laboratorio:

- Autoclave (SELECTA Mod. Cino-Matic); la esterilización se llevó a cabo durante veinte minutos a 121° C a 1,2 atm.
- Baño con Agitación (SELECTA Unitronic Mod. 320 OR)
- Espectrofotómetro (HITACHI Mod. U-1100)
- Agitador Mecánico
- Estufa Heraeus
- Campana de Flujo Laminar
- Balanza de precisión para Medios de Cultivo
- Baño para fusión de Medios de Cultivo Sólidos
- Microscopio Olympus BH2-RFCA
- Microscopio de Inmunifluorescencia
- Ultracentrífuga y tubos cónicos
- Escala de McFarland de 1 a 6 (BIOMERIEUX)
- Micropipetas (Gibson)
- Placas Petri de 9 cm de diámetro
- Tubos de vidrio de 10,3 mm \pm 0,2 mm de diámetro (Comercial Anger)
- Portas, Portas escavados y cubreobjetos
- Portaobjetos-MONOFUTM (para microscopía de fluorescencia)
- Mechero de pie
- Asa de siembra
- Asa de siembra calibrada a 4 λ
- Jeringas y agujas desechables para siembra de las diluciones
- Dispensador de agua destilada calibrado
- Micro pipeta Automática
- Puntas estériles de pipeta automática
- Varilla de Vidrio Acodada
- Matraces estériles de 100 ml para el inóculo

Para el estudio microbiológico de campo se ha utilizado:

-Sistema Microfilm (MILLIPORE):

- *Envases estériles para recogida de muestras
- *Embudo portafiltro estéril de polipropileno microfil de 100 cc.
- *Filtros estériles de membrana S-Pak cuadriculados con 0,45 mμ de tamaño de poro servidos en envase individual
- *Soporte de MILLIPORE de acero inoxidable para Filtración Bacteriana con sistema de Vacío y de liberación de membrana para su siembra
- *Jeringa de Vacío de metacrilato de 60 cc con válvula de tres vías para impulso manual de la filtración
- *Placa PetriPad hermética de 50 ml con cartón absorbente de ester de celulosa MCE
- *Mechero Bunsen de sobremesa
- *Pinza Millipore de acero inoxidable de bordes biselados esterilizables por flameado
- *Contador digital de colonias (COMECTA)

-Binax Now *Legionella* (para determinación de antígenuria) (LETI)

-Equate *Legionella* Water Test (LETI)

Los Medios de Cultivo empleados han sido:

Para el trabajo de laboratorio:

- Müller-Hinton agar para caldo (OXOID)
- Müller-Hinton agar para medio sólido (OXOID)
- Agar-Sangre y Agar-Chocolate medios sólidos (OXOID)
- BCYE medio selectivo sólido para *Legionella* (OXOID).

Para el trabajo en microbiología de campo con el sistema Microfil de MILLIPORE se han empleado los medios de cultivo:

- * *Pseudomonas* Isolation Medium
- * m-ColiBlue 24 Broth para recuento de *Escherichia Coli*
- * m-Endo Broth para recuento de Coliformes Totales
- * Fecal Coliform Medium para el recuento de Coliformes fecales

Estos medios se han preparado siguiendo en todos los casos las instrucciones para su reconstrucción indicadas en el correspondiente envase.

Otros productos y reactivos:

- Agua destilada estéril
- Agua de la Red de Abastecimiento del Ayuntamiento de Madrid
- Formalina al 1% en solución fisiológica (equivalente a formaldehído al 0,37%)
- Ortotolidina al 0,1 % (PANREAC)
- Bateria de tubos para clorimetría cualitativa en p.p.m. (clorómetro de campo de la Escuela Nacional de Sanidad).
- Sistema Enterotube (BECTON DICKINSON)
- Sistemas API 10 y API ZYM (BIOMERIEUX)
- Reactivos ZYM A y ZYM B (BIOMERIEUX)
- Parafina líquida (BIOMERIEUX)
- Colorantes para la tinción de Gram
- Colorantes para sedimento tras centrifugado (Auramina-Phenol para inmunofluorescencia en parasitología)
- Colorante MONOFLUOTM anti-*L. pneumophila* IFA test-kit Sanofi-Diagnostics (PASTEUR)
- Giemsa al 10%
- Hipurato (OXOID)

- Oxidasa – bastoncillos para la identificación – (OXOID)
- Medio de montaje para visión en inmunofluorescencia
- Aceite de cedro

*Método de Trabajo en Microbiología

El trabajo de laboratorio se ha realizado en todo momento siguiendo el protocolo de normas básicas y de seguridad para el laboratorio de microbiología¹⁴⁰, habiéndose repetido hasta cinco veces cada uno de los experimentos con los distintos gérmenes y aguas, así como en el trabajo de campo, y hasta tres veces en la experimentación con la *Legionella pneumophila*.

El protocolo específico seguido ha incluido las siguientes actividades:

♦ Contaminación experimental de las aguas:

- a) Control previo de esterilidad de las aguas del estudio.
- b) Curvas de letalidad:
 - 1) Preparación de los inóculos.
 - 2) Contaminación experimental del caldo nutritivo y de las aguas con los inóculos, e incubación en baño.
 - 3) Dilución y siembra en placas del caldo nutritivo y de las aguas, una vez contaminados, e incubación en estufa.
 - 4) Recuento de los gérmenes inoculados experimentalmente en el caldo nutritivo y en las aguas, y cálculo de las curvas de crecimiento.
- c) Valoración de la expresión enzimática inicial y de sus posibles cambios en los gérmenes estudiados.

Descripción y Justificación de la Sistemática de Laboratorio:

a) Control previo de esterilidad de las aguas del estudio:

A fin de descartar las aguas que no reunieran la calidad microbiológica exigible¹⁴¹, en todos los casos, antes de la correspondiente inoculación experimental, se procedió a un plaqueo directo de las diferentes aguas en medio de Mueller-Hinton, seguido de incubación en estufa a 37°C durante 24 horas.

b) Curvas de letalidad:

1) Preparación de los inóculos:

-1 a) Inóculo para la contaminación experimental de las aguas del estudio:

Antes de proceder al inóculo de los distintos gérmenes del estudio en las aguas, y para activarlos debidamente, se realizó en todos los casos un pase de los microorganismos a utilizar en cada experimentación, sembrándolos en una placa con medio de Mueller-Hinton, y una vez transcurridas 24 horas incubándose en estufa, se arrastraron con el asa en microambiente estéril, un número suficiente de las colonias crecidas las cuales se inocularon seguidamente en 50 ml de Caldo de Mueller-Hinton contenido en matraz y previamente atemperado.

A continuación, el matraz con dicho medio nutritivo así inoculado, se introdujo en el baño con agitación a 37°C, donde se mantuvo varias horas hasta que se obtuvo el número de gérmenes oportuno por unidad de volumen, el cual se midió con el espectrofotómetro, ajustado previamente a una absorbancia de 10^8 UFC/ml que se correspondía con 0,2 unidades nefelométricas que es el inóculo estándar en microbiología para la valoración *in vitro* de antibióticos¹⁴².

-1 b) Inóculo para el estudio de los cambios de expresión enzimática API:

(Analytical Profile Index)^{143 a 145}

En cada caso, partiendo de una muestra de volumen mínimo de 2 ml de agua destilada estéril, hacíamos en ella una suspensión inoculando varias colonias arrastradas con asa, también estéril, de una placa elegida al azar, de entre las distintas diluciones de la tercera hora, que previamente habíamos incubado, una vez sembradas, con el agua mineromedicinal en la que ya habíamos inoculado el germen en estudio (el protocolo de esta última siembra se describe mas adelante). Ejecutándose para cada caso, todo en microambiente estéril, y previa agitación para homogeneizar la suspensión, cuando habíamos conseguido que ésta alcanzase una densidad óptica correspondiente a los tubos 5/6 de la escala de McFarland que equivale a 15×10^8 UFC/ml, procedimos a dispensar 2 gotas de dicha suspensión en las distintas cúpulas de las Galerías del Sistema API ZYM de BIOMERIEUX (que más adelante se explica) las cuales seguidamente se incubaron durante 4 horas a 37°C.

-1 c) Inóculo para la contaminación experimental de las aguas mineromedicinales con *L. pneumophila*:

La *Legionella pneumophila* cedida para la investigación se sembró con asa estéril, en su medio nutritivo selectivo (BCYE), bajo campana de flujo laminar para activarla y disponer de suficientes colonias, y se incubó en estufa a 37°C incluyéndola en cámara húmeda. Transcurrida una semana, y una vez crecida, se arrastraban con asa estéril suficiente número de colonias que se inoculaban en 50 ml de agua destilada estéril hasta conseguir, tras su agitación y homogeneización, una turbidez correspondiente al tubo 5 de la escala de McFarland equivalente a 15×10^8 UFC/ml. Con este inóculo así preparado y siempre bajo campana de flujo laminar se procedió posteriormente a la contaminación experimental de su medio nutritivo y de las distintas aguas.

2) Contaminación experimental del caldo nutritivo y de las aguas con los inóculos e incubación en baño:

Cuando los diferentes microorganismos utilizados para esta investigación alcanzaban, en cada caso, en el caldo nutritivo inicialmente inoculados y tras su incubación, la concentración de 10^8 UFM/ml, se tomaba 1 ml de dicho caldo, para contaminar ahora matraces con 50 ml de caldo nutritivo, con 50 ml de cada una de las aguas mineromedicinales del estudio, también otros con la misma cantidad de agua de la red y aún otros con agua destilada, a fin de tomar el primero y éstas últimas como contraste. A continuación todos los matraces con el inóculo se introducían en baño también con agitación y a 28°C hasta 24 horas.

Se tomó esta temperatura de 28°C para la incubación de los inóculos en el caldo nutritivo (cuya curva es el CONTROL de sobrevivencia y multiplicación de los gérmenes), y en las aguas, a fin de ofrecer una temperatura promedio indiferente para el crecimiento microbiano y poder valorar la verdadera influencia de la composición del agua en dicho crecimiento. Asimismo, muy próxima a 28°C es la temperatura de emergencia del agua del estudio de campo.

3) Dilución y siembra en placas del caldo nutritivo y de las aguas una vez contaminados, e incubación en estufa:

Seguidamente, y para hacer el recuento de las colonias que pudieran crecer tras la contaminación experimental del caldo nutritivo y de las aguas en estudio, se efectuaron, siguiendo la técnica habitual de laboratorio, diluciones seriadas tomando 1 ml, del contenido contaminado de cada matraz que se añadía a tubos con 9 ml de agua destilada estéril.

A partir de esta última dilución, se tomaba 1 ml de nuevo que se añadía asimismo a un segundo tubo con 9 ml de agua también destilada y estéril, realizándose en total hasta cuatro diluciones sucesivas, desde 10^0 hasta 10^{-3} , de cada una de las cuales,

así como del caldo nutritivo y de las aguas inoculadas sin diluir, se fue sembrando con varilla de vidrio acodada 0,1 ml de dichas diluciones en placas con medio de Müller--Hinton que se incubaron a 37°C y se leyeron a las 24 horas de su incubación en estufa para hacer el recuento en esta hora cero y confirmar que la inoculación había sido efectiva.

Esta sistemática se repitió para el caldo nutritivo y todas las aguas inoculadas, pasadas 1, 2, 3 y 24 horas de su permanencia en el baño con agitación a 28°C, tras las cuales se sembraron en placa e incubaron a 37°C durante veinticuatro horas.

Para la *L. pneumophila*, dada la naturaleza y sensibilidad del germen, una vez hechas la inoculación a las aguas, se incubaron los matraces en estufa, en este caso, a 20°C durante 24 horas, y realizándose a partir de ellos las mismas diluciones, se procedió igualmente a las siembras en placa, en su medio selectivo, incubándose en estufa a 37°C en ambiente húmedo durante 48, 72, 96 y 120 horas.

4) Recuento de los gérmenes inoculados experimentalmente en el caldo nutritivo y en las aguas, y cálculo de las curvas de crecimiento:

Tras las correspondientes incubaciones, y para valorar el crecimiento del germen en su medio nutritivo en comparación con el que pudiera tener lugar en las aguas con él contaminadas, se procedió al recuento de colonias en las placas y al cálculo^{146,147} de la curva de crecimiento de los microorganismos inoculados en dichos medios, teniendo en cuenta para ello el número de gérmenes del inóculo y la dilución con la que se procedió a la siembra, según la siguiente fórmula general:

$$N=n \times \frac{1}{i} \times \frac{1}{d}$$

Siendo:

N = número total de microorganismos viables (UFC/ml)

n = número total de colonias crecidas en la placa

i = número de gérmenes del inóculo utilizado (10^8)

d = nivel de dilución

la cual hemos aplicado a partir de la expresión:

$$N = n \cdot 50 \cdot 10^x$$

donde

50 = factor que transforma la dilución de $\mu\text{l} \rightarrow \text{ml}$

$x = 0, 1, 2$ y 3 para obtener los distintos niveles de dilución

c) Valoración de la expresión enzimática inicial y de sus posibles cambios en los gérmenes estudiados:

Tanto a los gérmenes ATCC como a los de Aislado Clínico se realizó, como paso previo de todos los experimentos, una prueba con el Sistema API ZYM de BIOMERIEUX, que es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas, entre otras las microbianas, para evidenciar la expresión enzimática de cada uno de los distintos tipos de gérmenes a utilizar en el estudio, y para comprobar, en todos los casos, que dicha expresión coincidía con el Patrón de Referencia característico que cabía esperar. Calculadas las curvas e incubadas las galerías API ZYM correspondientes a los gérmenes del inóculo en el caldo nutritivo, y a los ya expuestos a las aguas, se procedió seguidamente a su lectura, añadiendo en sus cúpulas 1 gota de los reactivos ZYM A y ZYM B; pasados 5 minutos se valoró la expresión enzimática propia de cada germen para compararla con la obtenida tras la exposición de éstos a las aguas.

En el caso de la *L. pneumophila*, una vez efectuado el recuento, se procedió también a comprobar la posible existencia de cambios cualitativos en ella mediante las pruebas de hidrólisis del hipurato y la oxidasa e inmunofluorescencia, asimismo, antes y después de su exposición a las aguas.

♦ Estudio microbiológico del agua manantial, del agua servida y de las instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange:

Para el estudio microbiológico, una vez tomadas y trasladadas desde su origen las distintas muestras, se ha empleado la sistemática de laboratorio y simultáneamente la sistemática de microbiología de campo para el estudio *in situ*, a fin de valorar y proceder a la comparación de los resultados con ambos métodos¹⁴⁸.

- Sistemática del estudio de laboratorio:

- a) Recuento bacteriano directo de las aguas del manantial y de las aguas servidas (piscinas).
- b) Búsqueda de *L. pneumophila*, de algas y amebas en aguas del manantial, en las aguas servidas (piscinas) y en las instalaciones hidroterápicas

- a) Recuento bacteriano directo de las aguas del manantial y de las aguas servidas (piscinas):

Recogidas del seno del agua, en recipiente estéril lastrado, muestras de 500cc de agua del manantial y de las piscinas, durante y al final de los servicios de baño, a un promedio de tres tomas en los distintos trimestres de dos años consecutivos, se transportaron al laboratorio de acuerdo con las normas para este fin. Una vez atemperadas se procedía a sembrar en 4 placas con medio de Müeler-Hinton una

gota de dicha agua tomada del seno del recipiente con pipeta automática provista de punta estéril.

Tras la correspondiente extensión con asa de vidrio acodada y estéril se incubaban en estufa a 37°C durante 24 horas, procediéndose seguidamente a la identificación con las galerías de API 10 S de BIOMERIEUX que es un sistema de identificación estandarizado para enterobacterias y otros bacilos Gram (-), junto al sistema BBL[®] Enterotube[™] II y recuento de colonias en su caso, así como comparación de los resultados entre sí de las citadas placas simultáneamente sembradas.

- b) Búsqueda de *L. pneumophila*, de algas y amebas en aguas del manantial, en las aguas servidas (piscinas) y en las instalaciones hidroterápicas:

Con la misma periodicidad y técnicas de captación y transporte, se tomaron muestras de agua del manantial y de las piscinas para la búsqueda de *L. pneumophila*, igualmente, y con dicha periodicidad, se procedió a hacer un frotis con torunda estéril en la cara interna de las alcachofas de duchas, de bocas de grifos, de tuberías de vaciado de las piscinas así como de las toberas de aire en las piscinas de hidromasaje^{149,150}.

Teniendo en cuenta las normas de transporte para este germen y una vez en el laboratorio, se plaquearon las muestras con la sistemática antes descrita en medio BCYE. Las extensiones se realizaron en este caso con asa ordinaria bajo campana de flujo de laminar, se incubaron las placas en estufa a 37°C en ambiente húmedo y se procedió a su lectura a partir de las 48 horas y hasta 10 días para asegurar la negatividad.

El transporte de las torundas se realizó igualmente de acuerdo con las normas proporcionando en todos los casos la adecuada humedad. Ya en el laboratorio se sembraron las torundas, con la muestra obtenida en el frotis, en placas con medio BCYE que se incubaron y leyeron en las mismas condiciones que las aguas.

Simultáneamente, dada la condición de parásito facultativo intracelular, que tiene la *Legionella pneumophila*, y su dependencia de ciertas algas de agua dulce, se practicó en primer lugar, examen en fresco de las aguas del Balneario depositando 1 gota de la muestra entre porta y cubre para visualización a 100 y 400 aumentos a fin de identificar algas y amebas. Igualmente se hizo examen, a dichos aumentos, del sedimento obtenido de 4 tubos de 40 ml tras centrifugación a 3000 r.p.m. durante 3 minutos; también se visualizó dicho sedimento teñido con auramina-phenol para la búsqueda, por inmunofluorescencia, de posibles coccidios, tiñéndose finalmente con Giemsa al 10% durante 20 minutos para la identificación de otros protozoos, particularmente amebas¹⁵¹.

•Sistemática del estudio de campo:

- a) Siembra e incubación para el estudio de campo por el Sistema Microfilm (MILLIPORE) de las aguas manantiales y servidas del Balneario de Alange.
- b) Prueba rápida para la detección de *Legionella pneumophila* en agua.
- c) Prueba de antigenuria de *L. pneumophila* en personal del Balneario citado.

- a) Siembra e incubación para el estudio de campo por el Sistema Microfilm (MILLIPORE) de las aguas manantiales y servidas del Balneario de Alange:

Una vez recogidas en los frascos estériles las muestras del agua del manantial y de la utilizada en las piscinas, se procedió a flamear la cara superior de la rampa del

soporte, maniobra que se repitió antes de depositar sobre ella, con la pinza estéril la membrana filtrante para cada análisis.

Acoplados los embudos sobre cada membrana, en cada caso, se fueron vertiendo los 100 ml de agua de las muestras, reservándose debidamente conservada la sobrante para ser transportada y estudiada en el laboratorio de microbiología, y comparar los resultados a fin de validar, también en nuestro estudio, este método de campo. Cuando el agua se había filtrado, merced al vacío, se retiraba con la pinza estéril la membrana, la cual se colocaba en las placas de Petri cuya celulosa ya se había impregnado con los correspondientes medios nutritivos y de aislamiento. Una vez así sembradas, se introdujeron dichas placas en estufa a 37°C procediéndose a la identificación de los gérmenes por su crecimiento en los medios selectivos, y haciendo el recuento a las 24 horas y a las 48 horas con la cámara digital según el volumen de muestra.

b) Prueba rápida para la detección de *Legionella* en agua:

Esta prueba, Equate[®] Legionella Water Test (LETI), es selectiva para *Legionella* no presentando reacciones cruzadas con ningún microorganismo de los que suelen estar presentes en el agua, siendo su especificidad analítica superior a 10 unidades formadoras de colonias/ml. Se detecta con ella la *L. pneumophila* del serogrupo 1 siempre que hubiera 70 y más UFC/ml, lo cual constituye su sensibilidad analítica. La detección se basa en un ensayo de inmunoabsorción a partir del filtrado, en bomba de vacío a través de membrana, de un litro del agua problema, según la sistemática antes descrita, valorándose el resultado por reacción colorimétrica. Esta prueba se ha incluido por su utilidad en el trabajo de campo y complementada con la de la antigenuria, que a continuación se describe, permite una valoración rápida e *in situ* de la presencia de este germen en el entorno.

c) Prueba de antigenuria de *L. pneumophila* en personal del Balneario:

La colonización y/o infección por *L. pneumophila* del serogrupo 1 puede detectarse por el antígeno específico soluble que se halla en la orina a partir del tercer día de la fiebre y hasta un año. La prueba, Binax Now[®] Legionella (LETI), tiene una sensibilidad y una especificidad del 95% y consiste en un inmunoensayo cromatográfico sobre membrana, que se dispensa en soportes individuales para cada análisis¹⁵². Se ha determinado la antigenuria en el personal del Balneario, aún estando en su totalidad asintomático, para tomar el resultado como indicador indirecto de exposición a la *L. pneumophila* y proceder a su búsqueda exhaustiva en el recinto termal, si en algún caso fuera positivo, para descartar o confirmar este medio como causa de la colonización por dicho germen.

*Métodos Estadísticos

El procesamiento estadístico se ha realizado en el Departamento de Apoyo a la Investigación de los Servicios Informáticos de la U.C.M., con la atención del Dr. D. Ricardo García Mata, habiéndose contado también con la ayuda del Dr. D. Agustín Turrero del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de dicha Universidad.

El cálculo de la significancia estadística de las diferencias de vegetatividad de los gérmenes en las distintas horas y aguas mineromedicinales se ha efectuado mediante la comparación de Medias de crecimiento con el cálculo de Anova, seguido del Test de Comparaciones Múltiples de Duncan cuando el primero ha sido significativo, habiéndose utilizado el programa SPSS 11.5 para Windows (SPSS, 2002)¹⁵³.

□ **Protocolo de Hidrología Médica**

Instrumental y Reactivos

El instrumental y reactivos que seguidamente se especifican son los disponibles en los laboratorios de la Cátedra de Hidrología Médica del Departamento de Medicina Física y Rehabilitación. Hidrología Médica de la U.C.M.

- Autoclave TD
- Balanza Denver AA-160
- Cromatógrafo Iónico Dionex 2000i con supresión química
- Columnas para el estudio de aniones:
 - Guarda AG 4A
 - Separadora AS 4A
 - Supresora ASRS ultra
- Columnas para el estudio de cationes
 - Guarda CG12
 - Separadora CS12
 - Supresora CSRS ultra
- Conductímetro, pH-metro ORION RESEARCH, modelo SA250
- Desionizador LABCONCO WATERPRO- PS
- Destilador FISTREEM CYCLON
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica GBC 932 AA
- Espectrofotómetro UV-visible PERKIN ELMER COLEMAN 55
- Estufas HERAEUS T6120
- Integrador SPECTRA PHYSIC
- Mufla HERAEUS TM 110
- Potenciómetro Orión-9687800
- Bureta de llave graduada en décimas de ml
- Cápsulas de porcelana

- Matraces
- Matraz de Erlenmeyer
- Probetas
- Vasos de precipitados y pipetas
- Reactivos:

Ácido acético

SH - test: Hydrogen Sulfide Test Kit, modelo HS-C (HACH)

Solución alcohólica de fenolftaleína

Solución de Na_2CO_3 0,1N

Solución tampón de pH 4

Solución tampón de pH 7

*Método de Trabajo en Hidrología Médica

Las aguas mineromedicinales empleadas en la experimentación se han obtenido solicitándolas a sus centros de origen cuando no podían obtenerse envasadas, y tomando directamente sus muestras en el caso de las del estudio de campo, su caracterización hidrológica se basa en las determinaciones siguientes:

·Determinaciones analíticas:

- a) Conductividad a 25°C
- b) Residuo Seco a 180°C
- c) Alcalinidad
- d) Dureza
- e) pH
- f) rH
- g) Aniones y Cationes
- h) Radiactividad

- a) Como la conductividad¹⁵⁴ de un agua es proporcional a su mineralización total, se puede calcular la materia disuelta en una muestra utilizando un conductímetro. El YSI modelo 30 HANDHELD expresa los resultados en $\mu\text{S}/\text{cm}$, y en el caso de las aguas aquí utilizadas, se precisan estos resultados a 25°C .
- b) El residuo seco a 180°C complementa la prueba anterior proporcionando igualmente datos sobre la mineralización total que se obtiene al evaporar la muestra de agua en baño María seguida de secado en mufla. El cálculo del residuo seco se hace teniendo en cuenta la tara en las correspondientes pesadas, es decir gravimetría precedida de evaporación.
- c) La alcalinidad, como las anteriores, es una determinación auxiliar que cualitativamente está relacionada con el pH pero cuantitativamente no guarda correspondencia. Depende del poder tampón del agua, es decir de su contenido en ácidos débiles combinados a bases. La valoración de la alcalinidad se realiza mediante volumetría con ácido sulfúrico.
- d) La dureza cabe calcularla por volumetría complexométrica, también con licor hidrotimétrico; el resultado en grados hidrotimétricos por equivalencias permite el cálculo en mg/l de CaCO_3 que consta en las aguas del estudio.
- e) Para el cálculo del pH, que es expresión el potencial de hidrogeniones¹⁵⁵, se emplea tanto la colorimetría con soluciones indicadoras, como la potenciometría con electrodos de vidrio y de referencia.
- f) El rH, ó nivel de óxidoreducción del agua, se valora también con potenciometría, habiéndose empleado el potenciómetro ORION-967800, efectuándose los correspondientes cálculos a partir de la expresión: $\text{rH} = \frac{E_{\text{ox}}}{0,029 + 2\text{pH}}$.

- g) La determinación de los aniones y cationes se realiza utilizando métodos como la volumetría con ácido clorhídrico, con ácido sulfúrico, y la cromatografía iónica practicada con el cromatógrafo iónico DIONEX 2000I, los resultados de cuyas columnas se expresan en: mg/l y meq/l .
- h) Para la medida de la Radiactividad se ha contado con los Departamentos de Ciencias Médicas y Quirúrgicas -Cátedra de Física Médica- de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, que la ha valorado en los años 1990 y 1997; y con el Departamento de Física de la Universidad de Extremadura que asimismo ha efectuado la medición en el año 2002. Los resultados que constan, en el apartado de Material sobre las características de las aguas radiactivas utilizadas en este estudio^{156 a 158}, corresponden a los notificados en las citadas valoraciones que se han centrado en la concentración de radionúclidos. Las técnicas empleadas, según los informes emitidos por dichos departamentos, particularmente para el ²²²Radón fueron:

- 1) Espectrometría gamma a través de la desintegración de las emisiones de ²¹⁴Pb y ²¹⁴Bi
- 2) Medida por centelleo líquido

La recogida de las muestras para las determinaciones, la efectuaron en todos los casos los correspondientes técnicos que para ello emplearon recipientes con geometría Marinelli, procediendo posteriormente a la medida de la concentración de radón por medio de un detector de radiación INa (T1) .

RESEÑA DEL BALNEARIO DE ALANGE

RESEÑA DEL BALNEARIO DE ALANGE

- Características generales e historia del lugar.

El pueblo de Alange^{159,160} alcanza una extensión de 159,7 Km² y en la actualidad cuenta 2.603 habitantes, pertenece a la Comarca Natural de Las Vegas Bajas del Guadiana, está situado en la provincia de Badajoz a 38°47' de latitud y 6°15' de longitud, dista dieciocho kilómetros de Mérida, capital de la Comunidad Autónoma de Extremadura, y se asienta sobre una colina de 345 metros de altitud correspondiente a las estribaciones de la Cordillera Mariánica, de la que la Sierra de Peñas Blancas y la de Alange son un estribo transversal de pendiente suave por el norte y escarpada por el sur.

Estas sierras pertenecen al macizo Ibérico ó Hespérico, y dentro de éste a la zona de Ossa Morena cuyos límites son, a nivel septentrional la falla de Azuaga en la zona Centroibérica, así como el batolito de los Pedroches, la cuenca del bajo Tajo, el acabalgamiento de Ficalho, el borde sur de la banda metamórfica de Aracena y las fallas que continúan hasta alcanzar la depresión del Guadalquivir.

Geosnósticamente se puede decir que en la formación de Alange hay terrenos primitivos, secundarios y terciarios, con detritus y terrenos de aluvión modernos. La roca del periodo primario que constituye el núcleo de sus montañas es de “petrosilex agatoideo”, en las que corresponden al secundario se ve “gres rojo antiguo” y las que pertenecen al periodo terciario muestran “arcilla ferruginosa ó marga arcillosa”, “arcilla ocrácea amarilla” y “arcilla plástica esquistosa azul”.

La abundancia de rocas arcillosas que forman el piso inferior de los terrenos terciarios y que una vez saturadas de agua quedan impermeables, es causa de la abundancia de ésta en Alange.

Son varias las fuentes manantiales que se abren paso al pié de la Sierra de Peñas Blancas aunque por su caudal y temperatura cabe destacar la fuente que surge en la vertiente norte del Coso llamada “Jarilla” y la que mana en la vertiente sur que es la que surte al Establecimiento de Baños, ésta última brota a 27°C sin presentar cambios durante el año lo cual la acredita como termal, según criterio internacional, ya que la temperatura media anual de la localidad es de 16°C.

En cuanto a la historia, su origen se adentra en el pasado lejano ya que los distintos vestigios de asentamientos hallados, permiten que se considere el término de Alange “un museo de restos prehistóricos” que han sido estudiados por diferentes investigadores tales como Henri Breuil, y los equipos de Enriquez Navascués y Mordillo Durán, entre otros. Estos historiadores han valorado dos armas bifaz, que en esta zona son de cuarzo, y no de sílex, como elementos pertenecientes al Paleolítico Inferior (Fase Achelense) que superan los cien mil años encontrando también en el yacimiento llamado por ellos “taller” un conjunto muy variado de armas de piedra, ya del Paleolítico Medio (Fase Musteriense).

La Pintura Rupreste Esquemática, de carácter abstracto y simbólico, llamada así por utilizar la línea como base de su ejecución, que procedente de Oriente próximo apareció en España desde el año 4000 a. de J.C. hasta aproximadamente 600 años, también a. de J.C., está presente en numerosos abrigos de roca y paredes lisas del entorno de Alange, y unida a una “citania” ó pequeña fortificación sita en una de sus laderas, demuestran que en la Edad del Bronce ya tuvo núcleos de población asentada.

Hacia el año 550 a. de J.C. los celtas entraron en España poblando, entre otras zonas las márgenes del Guadiana. El historiador Vicente Navarro, al narrar la conquista romana de España, refiere la derrota que sufrieron los conquistadores al enfrentarse con las poblaciones celtíberas de Lyco y Dippo en los años 185 y 190 a.

de J.C. respectivamente, postulándose que Lyco (palabra ibera que significa lobo) sería el actual pueblo de Lobón y Dippto sería Alange aunque este autor basándose en la inscripción de unas monedas halladas en Lobón invierte el orden de lo aquí postulado en contra de otros autores.

Pero si el nombre del núcleo celtibérico de Alange es discutible, de ninguna manera lo es su identidad como población en la época romana.

Cabe suponer que su proximidad a Emerita Augusta, capital de la Lusitania, ciudad fundada por el Emperador Augusto hacia el año 25 a. de J.C. , que en el siglo IV llegó a ocupar el décimo lugar entre las ciudades mas importantes del Mundo Romano, le iría dando poco a poco dicha identidad¹⁶¹.

Pero es en la primera mitad del siglo III cuando se sitúa en Alange al miembro de una familia hispana de orden senatorial llamado Licinio Sereniano que fuera gobernador de Cappadocia el cual contrajo matrimonio con Varinia Flaccina que, según consta en lápida que se exhibe en la localidad pacense de Los Santos de Maimona, era hija de Gaius Varinius edil duumbiro flaminial de la provincia Bética.

La curación de la hija habida de este matrimonio, la Joven Varinia Serena, en las aguas manantiales de Alange pudo determinar la construcción no solo de un templete, hoy desaparecido y quizá soterrado dedicado a la diosa Juno en agradecimiento, tal y como se manifiesta en su lápida votiva, sinó también el edificio de Baños -que se incluye entre las llamadas Termas Monumentales del que se conservan dos espléndidas piscinas ubicadas en cámaras gemelas cubiertas de planta circular y actualmente en uso, que junto a otros vestigios confirman el pasado romano de Alange nombre que podría derivar de un inicial “Aquae”.

Del dominio visigodo, que no fue tal sinó un tranquilo periodo de encuentro e intercambio con la población hispano-romana, existen piezas de construcción,

restos de necrópolis y aras sepulcrales con inscripciones, y según Sáez de Buruaga, en este periodo el rey Wamba obligó al obispo emeritense Esteban a fundar una sede episcopal en Aquis, muy posiblemente la actual Alange, lo que está pendiente de confirmación.

Por su estratégica ubicación para controlar el paso de la inmediata Vía de la Plata también jugó un importante papel durante la dominación árabe. En esta etapa consta que se llamó Hisn Al-Hanash es decir -Castillo de la Culebra- en alusión al conjunto de calzadas ó caminos que subían hasta la fortaleza ubicada en el prominente cerro oeste, y que fué construida durante el siglo III a juzgar por la lápida allí encontrada que menciona el cuarto consulado del Emperador Cesar Marco Aurelio Antonio (Caracalla). Se discute si los árabes pasaron a su lengua el nombre Castrum Colubri que podría haber tenido en la época romana ó si esta última denominación se la dieron los cronistas medievales al latinizar el nombre árabe.

Que los árabes reconstruyeron la fortaleza y se emplazaron en su término es indiscutible, de su presencia y del segundo término del nombre que éstos le dieron, deriva el actual nombre de Alange que consta como Al-Fange en los anales toledanos que recogen su reconquista capitaneada por el Maestre Rodrigo Íñiguez en 1241 tras la que pasó a ser una de las Encomiendas de la Orden Militar y Hospitalaria de Santiago.

Al amparo de la monarquía de los Austrias y Borbones y con la administración de uno de los dos prioratos de la Orden de Santiago, el Priorato de San Marcos de León, ha ido permaneciendo Alange hasta que en el año 1819 Fernando VII agregó su Encomienda al Sacro Convento de la Orden de Calatrava.

- **BREVE RESUMEN HISTÓRICO DEL BALNEARIO**

Ya se ha referido a propósito de la historia del lugar que la parte monumental del actual balneario se construyó alrededor del siglo III d. de C., posiblemente^{162 a 164} bajo el auspicio de la Familia Sereniana la cual consta en una estela ó ara votiva encontrada entre las ruinas y hoy expuesta en uno de los patios del establecimiento termal con la siguiente inscripción:

IUNONI REGINAE SACRUM
LIC. SERENIANUS. V.C.E.
ET VARINIA ETACCINA. C.F.
PRO. SALUTE. FILIAE. SUAE
VARINIAE SERENAE
DEDICAVERT

“a la diosa Juno dedicaron este santuario Licinio Sereniano -varón esclarecido V.C.E.- y Varinia Flacina (debido a error del lapidario “Etaccina”) -clarísima fémia C.F.- por la salud de su hija Varinia Serena”

En dicha lápida esta Familia agradece a la diosa Juno ó Hera (diosa del matrimonio y de la fecundidad) la curación de su hija Varinia Serena, lo que orienta a pensar que padecía problemas de fertilidad siendo éste el origen del balneario, no obstante, cabe pensar que con anterioridad también se usaran sus aguas, aunque no conste.

Tras la época romana las instalaciones cayeron en desuso quedando soterradas sus ruinas pero no así el manantial cuyas aguas seguían fluyendo. Ya en el siglo XVIII se mencionan los llamados “Sudaderos de los Baños de Alange” relativos a que, en

las inmediaciones de la gran charca o laguna que el manantial había formado, se instalaron chozas y cabañas que ocupaban los pacientes después de bañarse y por las que abonaban una cuota al ayuntamiento.

Entre los años 1784 y 1790 Cristóbal del Solar y Mateo Antonio Vaca de Vargas promovieron distintas reformas para facilitar la balneación a la concurrencia. En 1817, al crearse la Dirección de Aguas Minerales, los Baños quedaron bajo la inspección del Gobierno del Rey Fernando VII y la protección de las autoridades de la provincia nombrándose, también ese año, el primer Médico-Director. En 1826, Don José San Juan Downe Capitán General de Extremadura, se alivió de sus padecimientos con el tratamiento termal y encargó al Teniente Coronel de Ingenieros la construcción de algunas de las actuales piscinas y de un lavadero público, también hoy en uso.

En 1838 y hasta 1858 fue nombrado Médico-Director Don Julián de Villaescusa cultísimo facultativo que en 1850 publicó la primera monografía sobre -el lugar, las aguas y el efecto de los baños- dando sobrada cuenta de su eficacia¹⁶⁵.

Ya en 1863 y de acuerdo con las leyes de desamortización, el balneario, que hasta ese momento era propiedad de la Diputación de Badajoz y estaba administrado por el municipio de Alange el cual ingresaba como arbitrio las cuotas de los bañistas, fué sacado a subasta pública y adquirido en 1867 por el Médico del Cuerpo de Baños Don Abdón Berbén Blanco, quién no obstante se comprometió a que las aguas sobrantes, tras las actividades balnearias, podrían ser utilizadas por los vecinos en fuente pública, en el lavadero municipal ó para el regado de las huertas.

Consciente, sin duda como médico, del servicio terapéutico que el Balneario ofrecía, D. Abdón Berbén amplió y modernizó las instalaciones dando a conocer las aguas, así como su utilidad, tanto en medios nacionales como internacionales, en los que obtuvo para ellas:

- “Mención Honorable” otorgada por el jurado internacional de la Exposición Universal de 1878 en París, y
- “Medalla de Oro” del Patronato de S.M. Alfonso XIII en la Exposición de Medicina e Higiene del Congreso Nacional de Medicina de 1919 de Madrid.

Asimismo en 1895, Don Abdón Berbén, publicó una magnífica monografía¹⁶⁶ que tituló “Las Aguas Bicarbonatadas Cálcidas de Alange” en la que, efectivamente, justifica con sobrada argumentación científica, según los conceptos médicos del momento, la capacidad terapéutica de dichas aguas, así como las distintas pautas para su adecuada aplicación.

Todo lo referido, además del marco y devenir histórico de utilización de sus aguas manantiales, el reconocimiento formal de una composición excepcional, y las reiteradas demostraciones de su capacidad terapéutica, ha determinado que este Balneario se haya situado entre los centros termales más destacados ya desde el siglo XIX, y que su numerosa concurrencia de pacientes, incluso durante la contienda civil, siguiera acudiendo tanto en las llamadas “temporadas oficiales” de estos servicios, que así regulaba el Estado, como en cualquier época del año dada la aparatosidad, urgencia y especial connotación social con la que muchas veces se presentaba la “enfermedad mental” hasta que se ha dispuesto de psicofármacos, avanzada ya la segunda mitad del siglo XX.

No obstante lo anterior, la cura del Balneario de Alange es compatible y además complementaria al tratamiento farmacológico del sistema nervioso, que es la primera y más tradicional indicación terapéutica de este Centro, por lo cual ha seguido y sigue administrándose en él -la terapia de sistema nervioso- aunque adaptada a la sintomatología de “los nuevos tiempos”¹⁶⁷. Tanto en el siglo XIX como durante el siglo XX y hasta la actualidad, los distintos médicos directores del Balneario han ido sistematizando protocolos terapéuticos para la patología nerviosa

como tal, y para sus diferentes somatizaciones, y asimismo para la patología reumática y respiratoria que son sus principales indicaciones, junto a otras que se describen más adelante, con un notable éxito, hasta el punto de que en estos momentos el número de bañistas que acude para estas dos últimas indicaciones es incluso mayor que para la indicación tradicional.

La Propiedad de Herederos de Abdón Berbén administrada desde 1972 por Don Luis Miguel Fernández-Chiralt y su esposa Doña M^a Dolores Navarro Tevar, estando ya en extinción el Cuerpo de Médicos de Baños y vacante por ello la Dirección Médica del Balneario, propuso para esta función al Médico Titular de Alange Don Germán Burgos, que oficialmente fue aceptado y desempeñó este servicio durante siete años ya que era el habitual colaborador del Médico del Cuerpo de Baños destinado a este Centro durante la temporada oficial, y además su sustituto cuando fuera de ella acudían pacientes.

En 1982, al estar próximo el traslado e inmediata jubilación de Don Germán Burgos, el Sr. Fernández-Chiralt, en el citado año 1982, propuso para la Dirección Médica del Balneario de Alange, obteniéndose la aceptación oficial, a Doña Margarita Romero Martín que, contaba entonces con estudios de Hidrología Médica por haber cursado el Doctorado en Medicina en la Universidad Complutense de Madrid, y desde el citado año ha prestado sus servicios en el Centro, además ya, como Médico Especialista en Hidrología, compartiendo dicha Dirección Médica a partir de 1986 con Doña Concepción Serrano Moreno también con doctorado en Hidrología Médica y asimismo Médico Especialista en Hidrología que es quien desempeña dicha Dirección Médica en la actualidad.

En Junio de 1986, la antes Propiedad de Herederos de Abdón Berbén se constituyó Sociedad Anónima, con el nombre ~Balneario de Alange S.A.~ y su Consejero Delegado Don Luis Miguel Fernández-Chiralt y esposa Doña María Dolores Navarro Tevar así como su Gerente Don Fernando Fernández-Chiralt Navarro, con

la asesoría técnica de las Médicas Especialistas en lo correspondiente a Servicios Terapéuticos, junto a su notable iniciativa en la actualización y nuevas aportaciones a los Servicios Generales y de Hostelería, de acuerdo con una admirable gestión, y el buen hacer de todo el personal técnico del Centro, han determinado la extraordinaria transformación del Complejo Balneario, haciendo posible que éste, también ahora, se sitúe entre los primeros puestos en cuanto a instalaciones y servicios crenohidroterápicos, no solamente de España sino también de Europa tal y como demuestra el número y la procedencia de sus usuarios, junto al universal reconocimiento de sus efectos, siendo además este Centro desde 1988 Socio Protector de la Sociedad Española de Hidrología Médica y desde 1996 Patrocinador del Premio Manuel Armijo Valenzuela para la promoción de Investigaciones en Hidrología Médica.

•Instalaciones del Complejo Hidrotermal y Servicios Terapéuticos

Las TERMAS ROMANAS de Alange fueron reconocidas como MONUMENTO NACIONAL en 1931 y como tal figuran en las guías turísticas correspondientes.

Como es bien conocido, la Civilización Romana incluyó desde sus inicios la construcción de Baños Públicos en las ciudades y de Termas entorno a los manantiales que presentaran características organolépticas, de fácil apreciación, diferentes a las del agua ordinaria, o una vez que se comprobaban sus propiedades medicinales. Se sabe que el baño en las Termas estaba reservado, sobre todo, para las élites sociales y así mismo para los atletas y la recuperación de los soldados¹⁶⁸.

Fue, sin duda, la proximidad de la vecina Emerita Augusta capital de la Lusitania, la Mérida actual, que es capital de la Autonomía Extremeña, tras la observación del importante efecto de las aguas que para la salud obtenían sus habitantes los cuales eran principalmente los Soldados y Administradores, ya Eméritos, es decir

jubilados, inicialmente de Augusto y después de otros Césares, lo que determinó, tras un progresivo y perseverante uso de éstos, como bañistas, la espléndida construcción romana que para este fin se ejecutó en Alange.

La parte funcional de dicha edificación que se conserva¹⁶⁹ está incluida en un gran bloque de mampostería que alberga dos cámaras circulares gemelas de 13,85 m. de altura y 10,90 m. de diámetro, cubiertas por bóvedas hemisféricas con 5,50 m. de radio que poseen un óculus circular central de 2,18 m. para el paso de la luz natural.

En los muros de ambas cámaras se abren cuatro exedras semicirculares cubiertas con bóveda de un cuarto de esfera que, junto a su utilidad arquitectónica para contrarrestar los empujes de la bóveda central, hoy sirven de vestuario reservándose una para gabinete hidróterápico. El centro geométrico de las cámaras lo ocupan respectivamente dos espléndidas piscinas circulares dotadas de graderío que se estrechan en embudo, alcanzando en su fondo 5,70 m. de diámetro interior.

Junto a la escalera también abovedada que le da acceso, anexo al bloque termal ahora en su lado oriental existen restos de otro edificio y más dependencias aún pendientes de excavación y trabajo arqueológico que pueden corresponderse con los espacios para el -caldarium- y la -sudatio- entre otros.

A partir del año 1972, de entre los Herederos de Abdón Berbén se delegaron, mediante el correspondiente acuerdo, las funciones de administración y gerencia, como ya hemos dicho, en la Familia Fernández-Chiralt Navarro, la cual, al habitual mantenimiento de las instalaciones que se venía haciendo, se dispuso a una actualización progresiva del Centro que, con la perspectiva actual, merece la calificación de “excelente” por la audacia a la vez que prudencia y visión de futuro demostrada en su desarrollo.

Con esta disposición, las instalaciones hidroterapéuticas se fueron adecuando a las propuestas del servicio médico especializado, con el que contaba el Balneario desde 1982, desempeñado por Doña Margarita Romero Martín permanente discípula de la formación que sobre la moderna Hidrología Médica ya entonces impartían los Profesores Don Manuel Armijo y Doña Josefina San Martín en la Cátedra de Hidrología Médica de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con la renovada corriente hidrológica que ya se estaba desarrollando en Europa.

Así, en el año 1982, se comenzó el archivo de la Historia Clínica que se abría a los pacientes, y bañistas en general, con una perspectiva de Hidrología Médica, en 1983 se incorporó la Ducha Subacuática a varios gabinetes de Bañeras como complemento a la balneación en los casos de tratamiento a la patología reumática que se consideraba adecuado.

En el año 1984, también a propuesta de la Dra. Romero Martín al considerar el beneficio que para las alteraciones, agotamiento y/o disfunciones del Sistema Nervioso, sobre todo, podía dar la Cura de Kneipp, se acondicionó, de acuerdo con el Sr. Fdez-Chiralt, parte del entorno del Centro mediante obra que diseñó y supervisó Don Fernando Fernández-Chiralt Navarro, Gerente del Balneario, para permitir la práctica de la “Pequeña Hidroterapia Kneipp” la cual demostró desde el principio su utilidad terapéutica basada en un reordenamiento del estilo de vida (circunstancia que facilita la aplicación de la cura termal con sus horarios y recomendaciones generales), y basada también en la capacidad equilibradora de los estímulos naturales ofrecidos al aire libre, siendo el Balneario de Alange el primero que contó con dicho servicio en España.

La Pradera Kneipp se asienta en 2800 m² de césped de grama que se extienden en tramos planos y de ladera que está ornamentada con 299 árboles, sauces, pinos y laureles, entre otros, y un pequeño lago artificial con peces, y que cuenta asimismo con, una pileta de 12 m² para practicar “el paso de garza en el agua” sobre la que

fluyen además dos chorros de agua mineromedicinal para humedecerse las manos, muñecas, nuca y flexuras de los codos tal y como está indicado en esta técnica de -pequeña hidroterapia- que se completa con un paseo sobre un “sendero de guijarros” de 400 pasos que recorre la pradera y sobre un “lago de arena”, todo lo cual permite al aire libre frente a los síntomas de estrés^{170 a172} estímulos de afrontamiento de las distintas texturas que ofrece la naturaleza, tolerancia progresiva de los menos agradables, fortalecimiento y, en definitiva, una reflexoterapia capaz de rehabilitar y reconciliar progresivamente la sensibilidad a los estímulos naturales y facilitar su efecto equilibrador, pudiéndose con todo ello reducir la ansiedad fácilmente diagnosticable entre los bañistas^{173,174} en la consulta termal, en la cual además de el diagnóstico y la prescripción hidrológica, es preciso establecer una adecuada relación psicoterapéutica dentro del marco termal¹⁷⁵.

El efecto terapéutico de este servicio fue notable desde el principio, demostrándose una rotunda modificación de la habitual tendencia al aislamiento que suelen presentar muchos pacientes con patología del sistema nervioso, también durante la cura, y reduciéndose asimismo la fobia a las aplicaciones con el agua fría que en muchos casos tenía lugar gracias al progresivo fortalecimiento que se logra además con los sencillos y suaves ejercicios que los monitores animan a realizar al aire libre junto al efecto estimulante de la luz natural y a la previa exposición a la radioemanación, de apreciables y objetivos efectos, que tiene lugar durante el baño^{176 a 179}.

En 1985, la Dra. Romero Martín valoró, que la notable composición del agua mineromedicinal tendría mejores efectos sobre el Aparato Respiratorio si se aplicaba ésta directamente en forma de microneblía obtenida por efecto Venturi con mascarilla, que los que ya ella venía observando en pacientes afectados de patología respiratoria que acudían al Balneario para tratar otra patología que también sufrían, y propuso que se creara un servicio de Aerosolterapia con el agua mineromedicinal que, una vez más, fue muy bien acogido por los Administradores y que llevó a cabo

el Sr. Fernández-Chiralt Navarro. Este servicio en la actualidad atiende un alto número de pacientes hasta el punto que casi iguala a los que atiende por patología reumática y degenerativa de aparato locomotor que es la segunda indicación del Balneario.

En 1988, tras la incorporación de Doña Concepción Serrano Moreno en 1986, el Centro promovió un curso en colaboración con el Excmo. Ayuntamiento de Alange y el INEM sobre “Terapia y Balneario” que monitorizó Doña Concepción Serrano Moreno con la colaboración de la Dra. Romero Martín, con cuyas enseñanzas teóricas y prácticas y su correspondiente evaluación se capacitó oficialmente al personal técnico, que ya tenía el Centro, y se habilitó a los demás alumnos para una posible y futura incorporación, tal y como ha sucedido, gracias al notable desarrollo del Balneario. Otro curso igual que el anterior sobre “Técnicas de Masaje” permitió la incorporación de un servicio de “Contactoterapia de Relajación” y el correspondiente desarrollo de nuevas instalaciones, este servicio resulta un gran complemento a la crenohidroterapia.

En 1990 la Doña Concepción Serrano Moreno propuso, también como complemento, añadir un servicio de “Parafangos” ya que el agua del Balneario no forma peloide, que igualmente se aceptó creándose la oportuna instalación que desde el principio viene rindiendo un extraordinario servicio al sumar, en unos casos, los efectos analgésicos, antiinflamatorios y tróficos de los parafangos a los del agua, y al proteger de los efectos del agua fría, en aquellos otros, que debe aplicarse así al estar indicado por patología del Sistema Nervioso y/o Curas de Relax.

Todas estas nuevas instalaciones incluída la construcción del Hotel Varinia en 1989 y la excelencia de todos los servicios, junto a la calidad mineromedicinal de las aguas y la actuación del Gabinete Médico Especializado, han permitido que el Balneario forme parte de la relación de Centros incluidos en el Programa de

Termalismo Social del INSERSO desde su inicio en 1989 (actual IMSERSO), y que se sitúe en los primeros puestos entre los centros solicitados por los beneficiarios dada la singularidad y efectos en su primera indicación, la patología del Sistema Nervioso tan frecuente en el estilo de vida actual, y el notable rendimiento también en las demás indicaciones.

Para responder a las exigencias de este Programa de Termalismo Social se ha ampliado la temporada oficial del Balneario, limitada antes al verano, y en sucesivas obras la primera en 1989 y la segunda en el año 2000 se han acristalado cada uno de los dos patios, el de acceso a la consulta y administración y el de las galerías de baños, que han permitido disponer de cómodos y estéticos espacios en los que relajadamente los agüistas esperan su turno o reposan tras el baño. Asimismo y en 1998 se ha construido un Salón de Actos de 208m² para las actividades científicas y sociales, y es donde, entre otras actividades, se imparten las “Charlas de Educación Sanitaria sobre Hidrología Médica” a los grupos del citado Programa de Termalismo Social.

En 1995 y a fin de poder ofrecer un servicio crenohidroterápico con agua caliente más activo que el que se ofrece con el baño en bañera para el tratamiento, en los casos que esté indicado, de la patología osteolocomotora tanto reumático-degenerativa como traumática ó de apoyo al entrenamiento deportivo y rehabilitación, se ha creado una piscina de agua caliente que cuenta también con -chorros de burbujas- para masaje intraacuático y ejercicios de marcha y movimientos resistidos. Asimismo ya en el año 2001 se ha habilitado una de las Piscinas Romanas, también, para baño en agua caliente y ambas para chorros de burbujas, a las cuales, desde el año 2001, se puede acceder desde la Pradera Kneipp cuando se desea, o cuando es necesario salvar el acceso por la escalera habitual.

Desde 1998 se dispone de Gabinete para Masaje Vichy y de Sala para Baño de Vapor, y desde el 2002 se dispone también, en sustitución de otra anterior, de una

piscina activa con una capacidad 150 m³ (agua termal desnaturalizada ya que está clorada y depurada) que se ha ubicado al aire libre para quienes pasan una estancia turística en el centro al no disponer de tiempo suficiente para una cura termal, y partir del año 2002, el Balneario cuenta con un amplio y estetico vestuario de 80 m², construido con ayuda de la Junta de Extremadura en el espacio que ocupaba la antigua Casita del Guarda, dotado de servicios y duchas que centraliza y sustituye de forma muy adecuada los vestuarios antes ligados a los distintos servicios crenoterápicos.

Con todo, la relación general de instalaciones y servicios crenoterápicos del Balneario de Alange en el año 2003 es la que sigue:

- Un Manantial de Agua Naciente a 28°C Oligometálica Radiactiva con caudal de 316 L/minuto sin oscilación estacional.
- Dos Piscinas Romanas de 30 m³ techadas en cúpula con fondo y graderío de mármol.
- Dos Piscinas de agua naciente (Lagunas del Manantial) techadas en cúpula de 110 m³ con fondo de guijarros.
- Una piscina techada de agua caliente de 25 m³ con sistema accionable de 14 jet para aplicación de burbujas.
- Una piscina turística al aire libre de 150 m³.
- 32 Bañeras de una pieza 150/200L de marmol de Macael ubicadas en gabinetes individuales, y algunos dobles, techados y con lucenario y ventilación regulable.
- Una sala de 30 m³ con solado y asiento colectivo de marmol para Baño de Vapor.
- Ocho Sistemas hidroterápicos para la administración de Chorros regulados con manómetro y termómetro y para Ducha Escocesa.
- Gabinete con Baño de Asiento y Sistema para aplicación de Irrigaciones Vaginales y Perineales.

- Una sala con 7 tomas de Oxígeno Medicinal para la aplicación individual de agua mineromedicinal en forma de aerosol con mascarilla, así como un sistema para la aplicación también individual de Gota Gruesa.
- Una sala con dos Hornos (SUBAQUA) para la preparación de Parafangos y capacidad para atender simultáneamente a 20 personas.
- Un solarium para la aplicación y secado de Baños de Arcilla (Bentonita).
- Una sala con 8 Camillas para la aplicación de Masajes (decontracturación post-traumática deportiva, accidental ó inflamatoria, contactoterapia de relajación, y drenaje linfático, entre otros,).
- Un gabinete para la aplicación de Masaje Vichy.
- Un Vestuario de 80 m² dotado con servicios y duchas.
- Dos gabinetes dotados para consulta y exploración médica.
- Laboratorio básico dotado de Estufa marca Selecta, nevera y demás aparataje para estudio hidrológico y microbiológico de campo.
- Dos Patios de 104 y 311 m² con techo acristalado y ventilación regulable para relajación y reposo pre/post-baño.
- Una Pradera Kneipp de 2800 m² para la aplicación de Pequeña Hidroterapia
- Un Hotel con 36 habitaciones.
- Kiosko-Bar acristalado para servicio de hostelería en la zona ajardinada del Centro.

Desde el año 1996 el Balneario recibe durante la temporada de verano a alumnos de segundo y tercer curso de la Escuela de Fisioterapia por acuerdo con la Universidad de Extremadura, que complementan su formación en hidroterapia auxiliando al personal técnico del Centro con la supervisión de sus facultativos y un fisioterapeuta profesional.

- Indicaciones de la Cura Termal en el BALNEARIO DE ALANGE

Las características físico/químicas, ya descritas, del agua manantial con la que cuenta el Balneario de Alange, determinan su calificación como AGUA HIPOTERMAL–OLIGOMETÁLICA–CLORURADO–BICARBONATADA–SÓDICO–CALCICO—MAGNÉSICA Y RADIATIVA y tras el adecuado diagnóstico médico y prescripción especializada junto a su oportuna administración en las instalaciones ahora disponibles en el centro, permiten, gracias a su composición y propiedades, la atención PREVENTIVO-TERAPEÚTICA de:

1. Afecciones del Sistema Nervioso:

- Psicosis Maníaco-Depresiva y Esquizofrénica en curso y en cronicidad
- Neurosis y afecciones Psicosomáticas
- Astenia, Surmenage y otros agotamientos nerviosos
- Epilepsia en sus distintas manifestaciones
- Disonía Neurovegetativa
- Neuralgias, Jaquecas, Cefaleas, Esclerosis Múltiple (en fases no agudas)
- Apoyo a la recuperación neurológica post-traumática
- Insomnio, Síndrome de las Piernas Inquietas
- Síndromes Emocionales por Climaterio tanto femenino como masculino
- Inquietud Psicomotriz de la Infancia
- Apoyo a la Estimulación Neuropsíquica en niños/as con discapacidad

2. Afecciones del Aparato Locomotor

- Artropatías degenerativas de cualquier localización, artrosis, osteoporosis, etc.
- Espondilitis y Sacroileitis Anquilopoyética
- Neuralgias asociadas a procesos degenerativos de columna vertebral: cervico-dorso-lumbo-sacro-coxalgias y lumbo-ciatalgias
- Artritis Reumática Juvenil y de otras edades (en fases no agudas)

- Reumatismos de partes blandas: Fibromialgia, Condritis, Tendinitis, etc.
- Recuperación frente a traumatismos de origen general y/o deportivo

3. Ginecopatías

- Dismenorrea
- Dispareunias
- Congestión Pélvica
- Síndromes de Insuficiencia Hormonal juvenil y postmenopaúsico

4. Afecciones del Aparato Respiratorio

- Catarro recidivante ó crónico de vías respiratorias altas: Sinusitis, Faringitis y Laringotraqueitis
- Asma Bronquial Intrínseco y por sensibilización alérgica
- Broncopatías crónicas (EPOC), Bronquiectasias, etc.

5. Disreacciones Cutáneas Alérgicas

- Atopia
- Urticaria
- Sensibilizaciones alérgicas

6. Alteraciones del Aparato Circulatorio

- Angina, Claudicación Intermitente y otras afecciones de espasticidad vascular
- Hipertensión Arterial esencial
- Arteritis, flebitis e insuficiencia venosa

7. Apoyo en Deporte, Descanso y Relajación en General

- Estimulación Crenohidroterápica en Entrenamientos
- Masajes simples y/o con aceites esenciales ó arcilla para relajación y/o recuperación de lesiones.

En las situaciones de polipatología y/o afecciones complicadas, la Cura se adapta a la evolución y tolerancia progresiva del paciente observados por el/la Especialista del Balneario, exigiéndose en estos casos el aporte de informes clínicos y/o estableciéndose el oportuno contacto con el equipo médico que habitualmente atiende al paciente para consensuar el tratamiento si se ve necesario. En estos casos, y en las afecciones graves del sistema nervioso, también se recomienda que se acuda al centro con cuidador/a.

La que sigue siendo primera indicación para la cura termal en Alange corresponde a las afecciones del sistema nervioso, en las cuales la balneoterapia administrada de forma periódica a lo largo del año, proporciona efectos suficientemente probados, acortando y sobre y todo previniendo las recaídas, no solo para la sintomatología psiquiátrica propiamente dicha, sino también para las manifestaciones neurológicas, de las que se puede acompañar aquella patología. Por otra parte notable es también el efecto, que el agua mineromedicinal tiene sobre la epilepsia y las otras afecciones del sistema nervioso antes especificadas^{179,180}.

En cuanto a las Contraindicaciones de la Cura en Alange, se corresponden con las generales de la Crenohidroterapia, es decir, pacientes con enfermedades infecciosas ó infectocontagiosas, en especial la tuberculosis activa, cardiopatías, hepatopatías ó nefropatías descompensadas, tumores malignos en evolución y estados caquéticos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Efectuado el trabajo de laboratorio de acuerdo con los objetivos para responder a nuestra hipótesis, pasamos a presentar los resultados que hemos obtenido.

Los resultados que se recogen en el conjunto de tablas nombradas como TABLAS -I- son, tal y como se exige en microbiología, la expresión logarítmica, del recuento de gérmenes, obtenido en cada uno de los cinco experimentos efectuados con las cuatro aguas mineromedicinales ya especificadas en Material y Métodos, para valorar la vegetatividad (crecimiento-letalidad) de los gérmenes Gram (+) y Gram (-) incluidos en el estudio, así como frente a la *Legionella pneumophila* tras las diferentes horas de exposición de estos gérmenes a las aguas. La proximidad de los resultados obtenidos para cada microorganismo en los distintos experimentos informa de la idoneidad del método seguido.

En el conjunto nombrado como TABLAS -II- se presentan la RII (Reducción del Inóculo Inicial), el porcentaje de dicha Reducción, la expresión gráfica de las curvas del promedio de vegetatividad alcanzada por los gérmenes en los cinco experimentos realizados en cada caso e iconografía del trabajo de laboratorio.

El grupo TABLAS -III- muestran la significancia obtenida en el análisis estadístico de los resultados.

El estudio de la expresión enzimática inicial de los gérmenes y de sus posibles cambios se presenta en el bloque de TABLAS -IV- que incluye los resultados correspondientes a las dos formas de cada germen en relación con cada agua y asimismo en el conjunto de todas ellas.

Igualmente, en la relación de tablas de resultados se incluyen las imágenes del estudio de inmunofluorescencia inicial de la *Legionella pneumophila* y tras su exposición a las aguas mineromedicinales, y por último la iconografía del Balneario de Alange.

I.- El estudio experimental sobre vegetatividad de gérmenes patógenos en aguas mineromedicinales

- VEGETATIVIDAD EN AGUA SULFATADO-SÓDICA-HIPERTÓNICA (S.S.H.)

A) *Staphilococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

El patrón de crecimiento que en el medio nutritivo ha presentado el *S. aureus* Coagulasa (+) ATCC, de progresiva multiplicación que alcanza su máximo en la tercera hora a partir de la que inicia su inhibición, es el que ha seguido también en el agua S.S.H., aunque dicha multiplicación en el agua mineromedicinal, así como en la destilada y en la de la red durante las dos primeras horas, fue claramente inferior que en aquel medio habiendo presentado en todas una reducción de mas de una unidad logarítmica de diferencia. A partir de la tercera hora y tras un ligero incremento de los gérmenes en el agua mineromedicinal, se demuestra una progresiva inhibición de los mismos que a las veinticuatro horas ya había descendido al nivel que alcanzó en la primera, siendo finalmente en este agua, no obstante, la multiplicación del germen 1,58 unidades logarítmicas inferior a la que alcanza en el medio nutritivo. En las aguas, destilada y de la red, la inhibición de los gérmenes tras la segunda hora fue notable, reduciéndose en

ellas claramente el inóculo inicial. Frente a un 141% de crecimiento en el agua mineromedicinal, las aguas destilada y clorada lograron una reducción del inóculo inicial del 88,92% y 91,59% respectivamente.

El germen procedente de Aislado Clínico presentó curvas con discreto crecimiento durante la primera hora en el agua S.S.H. y en el agua de la red, a partir de la que se aprecia una progresiva inhibición en ambas que no logra sin embargo en el caso del agua mineromedicinal si quiera igualar el número de gérmenes del inóculo inicial a las veinticuatro horas, en las cuales dicho inóculo se mantenía con un incremento de 0,19 unidades logarítmicas; no obstante el perfil de multiplicación es de 2 unidades logarítmicas inferior al que sigue este germen de Aislado Clínico en el medio nutritivo, siendo en conjunto el perfil más plano que el del germen ATCC. En el agua de la red, a partir de la primera hora se inicia una discreta inhibición de los gérmenes que se hace más apreciable a partir de la tercera hora, estando presente desde el primer momento esta inhibición en el agua destilada que logró que fuera mayor a las veinticuatro horas que en el germen ATCC. Frente a un 53,23% de incremento del inóculo en el agua mineromedicinal, las aguas destilada y de la red lograron un 93,55% y un 91,94% de reducción respectivamente.

Vegetatividad del *S. aureus* Coag. (+) a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|-----------------------|---------|--------------------|--------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | Inóculo Inicial= 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,96 | | -2,19 | |
| Ag. S.S.H.(1) | -0,38 | -141,94 | -0,19 | -53,23 |
| Ag. Destilada (2) | 0,96 | 88,92 | 1,19 | 93,55 |
| Ag. Red (3) | 1,07 | 91,59 | 1,09 | 91,94 |

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* Coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico en las 1ª, 2ª, 3ª y 24 horas de exposición al agua S.S.H., ha mostrado diferencia significativa con la media de crecimiento alcanzado en el caldo nutritivo y asimismo con la habida en las aguas de control salvo en la 1ª hora en la que no muestra diferencia con el crecimiento en el agua de la red para este número de experimentos con un p-Valor de ANOVA $<.0001$.

En cuanto al efecto que el agua S.S.H. tiene sobre las enzimas de ambos tipos de gérmenes, se aprecia un moderado porcentaje de cambios enzimáticos, que es claramente mayor en el *S. aureus* de Aislado Clínico, en el cual descienden de manera apreciable la Esterasa, Esterasa Lipasa, Cistina Arilamidasa y la α -Glucosidasa, que en la forma ATCC en la que se observa descenso de la Esterasa Lipasa y Fosfatasa Ácida. El descenso del nivel de enzimas, tanto de las inmediatamente antes citadas, como de la Fosfatasa Alcalina, ha sido globalmente mas acentuado en el agua destilada y en el agua de la red donde efectivamente estos gérmenes han presentado mayor inhibición que en el agua S.S.H. .

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

La forma de germen ATCC alcanza en el medio nutritivo el máximo de su multiplicación a la tercera hora de ser inoculado, tras la cual inicia una discreta inhibición. A diferencia de ello en el agua sulfatada-sódica-hipertónica el germen ha presentado una discreta inhibición del inóculo inicial en meseta durante todo el tiempo de exposición, logrando a las veinticuatro horas una reducción de aquel en 0,19 unidades logarítmicas con una diferencia de crecimiento final frente al medio nutritivo de 1,41 unidades logarítmicas. Frente a esta inhibición en meseta, el agua destilada y sobre todo el agua de la red lograron una reducción del inóculo inicial de 1,14 y 1,35 unidades logarítmicas.

El 34,71% de reducción en el agua mineromedicinal se elevó a 92,74% en el agua destilada y a 95,56% en el agua de la red.

El germen de Aislado Clínico se ha comportado con mayor vitalidad que la forma ATCC, tanto en este agua mineromedicinal como también, durante las primeras tres horas en la de la red, no obstante en la primera ya a las veinticuatro horas este agua logró una reducción del inóculo inicial hasta dejarlo en 0,10 unidades logarítmicas frente a las 1,26 unidades de incremento que alcanzó en ese momento en el caldo nutritivo. En las otras aguas citadas se observa a partir de la primera hora de exposición una progresiva inhibición, desde el incremento mostrado hasta la primera hora, que finaliza con una reducción del inóculo inicial de 0,86 y 1,04 unidades logarítmicas respectivamente, lo que supone un 86,31% y un 90,91% asimismo de reducción.

Vegetatividad del *E. coli* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|-----------------------|-------|--------------------|---------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | Inóculo Inicial= 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,22 | | -1,26 | |
| Ag. S.S.H.(1) | 0,19 | 34,71 | 0,10 | - 27,24 |
| Ag. Destilada (2) | 1,14 | 92,74 | 0,86 | 86,31 |
| Ag. Red (3) | 1,35 | 95,56 | 1,04 | 90,91 |

La media (μ) de crecimiento del *E.coli* ATCC en el agua S.S.H. ha mostrado en todas las horas una diferencia significativa respecto a la alcanzada en el medio nutritivo, no apareciendo diferencias en el crecimiento del germen respecto al alcanzado en el agua destilada y clorada de la red en la 1ª hora, para este número de experimentos, aunque aquellas si han existido en la 2ª, 3ª y 24 horas.

El germen de Aislado Clínico creció fácilmente durante la 1ª hora en el agua S.S.H. no mostrando diferencia significativa, para este número de experimentos, respecto al crecimiento que tuvo en el medio nutritivo, ni tampoco con el que mostró en el agua clorada de la red; en la 2ª hora el crecimiento en el medio nutritivo presentó ya diferencia significativa con el que hubo en este agua mineromedicinal, pero no así entre ésta y el agua de la red y a su vez con el agua destilada. Las diferencias fueron también significativas en la 3ª y a las 24 horas respecto a las aguas de control donde el germen creció menos, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

El efecto que sobre las enzimas del *Escherichia coli* tiene el agua S.S.H. determina un promedio de hasta un 50% de cambios en la forma ATCC y en torno a un 75% en el germen de Aislado Clínico, en ambos casos los cambios han sido en el sentido de aumento del nivel de las enzimas en especial de la Fosfatasa Alcalina y Leucina Arilamidasa y descenso de Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa así como β -galactosidasa todo ello de acuerdo con su multiplicación y sobrevivencia en dicha agua mineromedicinal; para las aguas de control los cambios sin embargo han sido de disminución del nivel de las enzimas, sobre todo la Fosfatasa Alcalina y la N-acetil- β -glucosaminidasa entre otros, constatándose en ellas una mayor inhibición de los gérmenes.

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de este germen ha presentado en el agua S.S.H. un perfil de sobrevivencia en meseta hasta la segunda hora con posterior inhibición logrando una inhibición final del inóculo de hasta 0,37 unidades logarítmicas, frente a esto cabe señalar que el germen en el caldo nutritivo presenta un perfil de crecimiento con recuperación en la tercera hora determinando una diferencia final de 1,33 unidades logarítmicas en relación con el agua mineromedicinal; en

el agua destilada y en la de la red hay una progresiva inhibición siendo la reducción final de un 57,22%, 87,99% y 94,06% para las distintas aguas.

El microorganismo de Aislado Clínico presenta también en este agua S.S.H. un perfil de sobrevivencia durante todo el experimento, con ligera multiplicación en la segunda hora, aunque el inóculo inicial se redujo hasta quedar solo en 0,03 unidades logarítmicas; por el contrario en el agua destilada y en la de la red presentó una progresiva reducción del inóculo hasta en un 86,09% y 96,49% respectivamente.

Vegetatividad de la *Ps. aeruginosa* a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|-------|--------------------|--------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -0,96 | | -0,96 | |
| Ag. S.S.H.(1) | 0,37 | 57,22 | - 0,03 | - 7,89 |
| Ag. Destilada (2) | 0,92 | 87,99 | 0,86 | 86,09 |
| Ag. Red (3) | 1,23 | 94,06 | 1,45 | 96,49 |

La media (μ) de crecimiento de la *P.aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico en el agua S.S.H. tiende en ambos casos, tras multiplicarse ligeramente, a la reducción del inóculo inicial. Presenta diferencias significativas respecto al superior crecimiento que alcanza en el medio nutritivo en todas las horas de exposición, y asimismo las presenta con el inferior crecimiento que tiene en las aguas de control, salvo en la 1ª hora del germen Aislado Clínico donde el crecimiento es semejante en todas las aguas, para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

El agua S.S.H. ha producido también en este germen un cambio de sus enzimas en el sentido de aumento en la forma ATCC de la Fosfatasa Alcalina, Esterasa Lipasa y Lipasa y de reducción en la forma de Aislado Clínico también de la Esterasa Lipasa y Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, siendo esto último asimismo lo que ocurre al enfrentarlo a las aguas de control en las cuales se han inhibido los gérmenes de manera más acentuada disminuyendo la Leucina Arilamidasa también en estas aguas.

D) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

La *L. pneumophila* ha seguido en el agua S.S.H. y en el agua destilada un perfil de crecimiento en las primeras cuarenta y ocho horas, durante las cuales incrementó en 1,02 y 0,64 unidades logarítmicas respectivamente el inóculo inicial; a partir de ese momento presenta un progresivo descenso en ambas, aún cuando éste fue menor en el agua mineromedicinal, manteniendo al final del experimento un incremento de 0,74 unidades logarítmicas sobre el inóculo que no obstante determinó una diferencia de 0,90 unidades logarítmicas entre el crecimiento del germen en su medio nutritivo y en este agua mineromedicinal en la cual se multiplicó notablemente menos. El agua destilada, donde también el germen proliferó inicialmente logra una mayor reducción que el agua mineromedicinal por lo que finalmente el inóculo se incrementó en ella solo en 0.09 unidades logarítmicas. En el agua de la red la inhibición fue total ya en las primeras horas, siendo por tanto la reducción de 100% ; en este caso, frente a un crecimiento del 451,61% en el agua mineromedicinal, en la destilada fue de 23,12% perdiendo el germen su característica de inmunofluorescencia en ambas aguas.

Vegetatividad de la *L. pneumophila* mediada su exposición a las aguas

SG 1

| | Unidad Logarítmica | % |
|--------------------------------|--------------------|----------|
| Inóculo Inicial= | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,64 | |
| Ag. S. S. H. (1) | - 0,74 | - 451,61 |
| Ag. Destilada (2) | - 0,09 | - 23,12 |
| Ag. Red (3) | 0 | 0 |

La media (μ) de crecimiento de la *Legionella pneumophila* SG 1 ha mostrado diferencias significativas entre su mayor multiplicación en el medio nutritivo respecto a la alcanzada en el agua S.S.H. y a su vez entre ésta y el agua destilada, en todas las horas de exposición para un p-Valor de ANOVA <.0001 .

- VEGETATIVIDAD EN AGUA BICARBONATADA SÓDICA (B.S.)

A) *Staphylococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

El microorganismo ATCC en el agua bicarbonatada sódica ha presentado un perfil de crecimiento en la primera hora y asimismo en el agua de la red, a partir de dicho momento ha seguido en una progresiva inhibición, más acusada en el agua de la red que en la mineromedicinal donde a las veinticuatro horas presentó aún un incremento del inóculo inicial de 0,26 unidades logarítmicas lo que no obstante supone 1,70 unidades logarítmicas menos que el crecimiento que alcanzó en el caldo nutritivo. En las aguas de control la inhibición ha sido algo mayor y desde el principio, sobre todo, en la destilada, lográndose una reducción efectiva del inóculo de un 88,92% en ella y de 83,51% en la de la red.

La forma de Aislado Clínico ha presentado un perfil de ligera multiplicación y sobrevivencia en meseta hasta la tercera hora en el agua bicarbonatada sódica y en la de la red aunque en esta última en niveles algo inferiores, a partir de la tercera hora en ambas se aprecia una progresiva inhibición que finalizó con tan solo un incremento del inóculo inicial de 0,16 unidades logarítmicas en el agua mineromedicinal y una diferencia de 1,98 unidades logarítmicas frente al crecimiento del germen en el medio nutritivo. Las aguas de control consiguieron una reducción del inóculo del 93,55% en la destilada y de 63,08% en la de la red.

Vegetatividad del *S. aureus* Coag. (+) a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|---------|--------------------|---------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -1,96 | | -2,14 | |
| Ag. B. S. (1) | - 0,26 | - 83,15 | - 0,16 | - 46,06 |
| Ag. Destilada (2) | 0,96 | 88,92 | 1,19 | 93,55 |
| Ag. Red (3) | 0,78 | 83,51 | 0,43 | 63,08 |

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* coagulasa (+) en las formas ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo muestra diferencias significativas respecto al que alcanza en el agua B.S. en todas las horas de exposición, asimismo, muestra diferencias significativas de crecimiento en este agua mineromedicinal respecto a las aguas de control salvo en la 1ª hora del germen ATCC y en las 1ª, 2ª y 3ª hora del Aislado Clínico donde no aparecen para este número de experimentos, para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

La moderada a alta modificación de las enzimas en la forma ATCC del *S. aureus* Coag. (+) fue algo menor en la de Aislado Clínico habiendo disminuido éstas en ambas formas del germen en particular la Fosfatasa Alcalina, Fosfatasa Ácida y

α -Glucosidasa, lo cual ocurrió asimismo tras el contacto del germen con las aguas de control en las que además disminuyó la Leucina Arilamidasa, Esterasa Lipasa y α -Glucosidasa sobre todo en el agua destilada y en la forma de Aislado Clínico.

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

El microorganismo ATCC ha proliferado en el agua bicarbonatada sódica durante la primera hora hasta el punto de superar en una centésima de unidad logarítmica el crecimiento del germen en el medio nutritivo. En forma parecida se comportó en el agua de la red pero con niveles algo menores en ésta. Durante la segunda hora y hasta el final del experimento se observa una inhibición progresiva en dichas aguas por la que prácticamente el número de gérmenes en el agua mineromedicinal se igualó con el del inóculo inicial presentándose una diferencia con el crecimiento final en el caldo nutritivo de 1,14 unidades logarítmicas. La reducción en el agua destilada fue del 92,74% y en el agua de la red de 70,81%.

El germen de Aislado Clínico también ha seguido un perfil semejante al anterior aunque en este caso el agua destilada y sobre todo la de la red consiguió reducir más el inóculo inicial desde la primera hora que la mineromedicinal, en la que tras una clara multiplicación del germen en la primera hora se inicia una ligera inhibición que finaliza igualando el número de gérmenes inoculado. La diferencia de crecimiento del germen entre el agua bicarbonatada sódica y el medio nutritivo ha sido de 1,09 unidades logarítmicas y la reducción de 86,31% en la destilada y de 44,44% en el agua de la red.

Vegetatividad del *E. coli* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|-----------------------|---------|--------------------|---------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | Inóculo Inicial= 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,22 | | -1,26 | |
| Ag. B. S.(1) | - 0,08 | - 20,50 | - 0,17 | - 48,92 |
| Ag. Destilada (2) | 1,14 | 92,74 | 0,86 | 86,31 |
| Ag. Red (3) | 0,53 | 70,81 | 0,26 | 44,44 |

La media (μ) de crecimiento del *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo solo ha mostrado diferencias significativas de crecimiento en el agua B.S. respecto a las aguas de control, y éstas entre sí, solo casi en la última hora y no en la 1ª, 2ª y aún 3ª hora, para este número de experimentos, donde la multiplicación en dicho medio nutritivo ha sido semejante a la alcanzada en este agua mineromedicinal y en la clorada de la red, para un p-Valor de ANOVA de 0.0003 en la 1ª hora del germen ATCC y de 0.0002 en la misma hora del Aislado Clínico, y de <.0001 en las demás horas.

Los cambios enzimáticos han sido de moderados a altos afectando sobre todo en ambas formas del germen a la Fosfatasa Alcalina, β -Galactosidasa y Naftol-A-S-BI- Fosfohidrolasa en los que han disminuido; las aguas de control han producido también reducción de algunos de esos de los enzimas y de la Esterasa, Fosfatasa Ácida, Leucina Arilamidasa en ambas formas del germen.

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

El germen ATCC presenta en el agua bicarbonatada sódica un perfil de inhibición progresiva que a partir de la primera hora y hasta la tercera se mantiene en

meseta y tras una ligera recuperación finaliza con una reducción del inóculo inicial de 0,25 unidades logarítmicas que supone una diferencia de 1,21 unidades logarítmicas respecto al crecimiento final en el medio nutritivo. La reducción del inóculo en el agua destilada y de la red ha sido de 87,99% y de 97,31% respectivamente.

El microorganismo de Aislado Clínico, tras un ligero crecimiento durante la primera hora en el agua bicarbonatada, presentó una progresiva inhibición tanto en ella como en las aguas de control aunque en estas aguas fue más acentuada, logrando una reducción en el inóculo inicial de 0,35 unidades logarítmicas en el agua mineromedicinal lo que supone un 55,02%, y una diferencia respecto a la multiplicación de gérmenes alcanzada a las veinticuatro horas en el medio nutritivo de 1,31 unidades logarítmicas. La inhibición fue de un 86,09% en el agua destilada y de un 95,34% en el agua de la red.

Vegetatividad de la *Ps. aeruginosa* a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|-------|--------------------|-------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -0,96 | | -0,96 | |
| Ag. B. S. (1) | 0,25 | 43,94 | 0,35 | 55,02 |
| Ag. Destilada (2) | 0,92 | 87,99 | 0,86 | 86,09 |
| Ag. Red (3) | 1,57 | 97,31 | 1,33 | 95,34 |

La media (μ) de crecimiento de la *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha diferido significativamente respecto al menor crecimiento alcanzado en el agua B.S. y en las de control en todas las horas de exposición, salvo en la 2ª hora en la que ambas formas del germen no presentan diferencias

de crecimiento, para este número de experimentos, en el agua mineromedicinal y en el agua destilada para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

Salvo en la forma ATCC donde los cambios presentan un ligero aumento de enzimas tales como la Esterasa Lipasa, Lipasa, Leucina Arilamidasa en el agua mineromedicinal donde efectivamente el germen logra una discreta recuperación, la forma de Aislado Clínico, excepto la Fosfatasa Ácida que aumenta, tanto en el agua bicarbonatada sódica como en las de control disminuye sus enzimas sobre todo la Lipasa, Leucina Arilamidasa y Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa.

D) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

Tanto en el agua bicarbonatada sódica como en el agua destilada, durante las primeras cuarenta y ocho horas tras la inoculación este microorganismo se multiplicó incrementando su número en 0,78 unidades logarítmicas y en 0,64 unidades logarítmicas respectivamente. Pasado este periodo inició una progresiva inhibición, mayor en el agua destilada, que al cabo de las ciento veinte horas del experimento determinó por un lado un incremento del inóculo en 0,60 unidades logarítmicas en el agua mineromedicinal, y por otro, que se igualara con el citado inóculo en el caso del agua destilada; no obstante en ambos casos el germen perdió la condición de inmunofluorescencia y un crecimiento en el agua bicarbonatada de 1,04 unidades logarítmicas menor que en su medio nutritivo. En el agua de la red la inhibición fue total en las primeras horas del estudio con una reducción del 100% frente al incremento del 294,09% en el agua mineromedicinal y del 23,12% en el agua destilada.

Vegetatividad de la *L. pneumophila* mediada su exposición a las aguas

SG1

| | Unidad Logarítmica | % |
|--------------------------------|--------------------|----------|
| Inóculo Inicial= | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,64 | |
| Ag. B. S. (1) | - 0,60 | - 294,09 |
| Ag. Destilada (2) | - 0,09 | - 23,12 |
| Ag. Red (3) | 0 | 0 |

La media (μ) de crecimiento de la *Legionella pneumophila* SG 1 en el medio nutritivo ha diferido significativamente, respecto al crecimiento alcanzado en el agua B.S. en todas las horas de exposición, y a su vez el que presenta en el agua destilada, salvo en la primera etapa de exposición donde para este número de experimentos no muestra diferencia significativa de multiplicación todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

- VEGETATIVIDAD EN AGUA CARBOGASEOSA (CRB.)

A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de Aislado Clínico

El microorganismo ATCC ha presentado en el agua carbogaseosa un ligerísimo aumento del número de gérmenes inicialmente inoculados durante la primera hora de exposición, a partir de ella mantiene una sobrevivencia en meseta que determinó que al final del experimento el inóculo se incrementara en 0,26 unidades logarítmicas siendo, no obstante la diferencia en ese momento con el crecimiento en el caldo nutritivo ha sido de 1,70 unidades logarítmicas. En el agua destilada ha presentado una reducción del 88,92% y en la de la red del 63,28%.

En cuanto al germen de Aislado Clínico el perfil es semejante pero en este caso tras una ligera multiplicación y sobrevivencia en meseta inicia una inhibición a partir de la tercera hora por la que se redujo el inóculo inicial en 0,32 unidades logarítmicas, esto supone una diferencia con el crecimiento en el caldo nutritivo de 2,46 unidades logarítmicas. En el agua destilada presentó inhibición progresiva que determinó una reducción del inóculo del 93,55%. El agua de la red también ocasionó inhibición progresiva hasta la tercera hora tras la que ésta se acentuó notablemente hasta reducir el inóculo en un 93,62%.

Vegetatividad del *S. aureus* Coag. (+) a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|---------|--------------------|-------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| Inóculo Inicial= | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,96 | | -2,14 | |
| Ag. C. G. (1) | -0,26 | - 80,11 | 0,32 | 52,08 |
| Ag. Destilada (2) | 0,96 | 88,92 | 1,19 | 93,55 |
| Ag. Red (3) | 0,44 | 63,28 | 1,20 | 93,62 |

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* Coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico ha mostrado para todas las horas de exposición diferencia significativa respecto al crecimiento alcanzado en el agua C.G., no habiendo existido dicha diferencia de crecimiento, para este número de experimentos durante las tres primeras horas de exposición, entre la multiplicación alcanzada en el agua mineromedicinal y la obtenida en el agua clorada de la red durante las tres primeras horas en el caso del germen ATCC, mientras que sí la hubo respecto al crecimiento de esta forma del germen en el agua destilada.

La sobrevivencia del germen de Aislado Clínico en el agua C.G. ha superado de forma significativa la alcanzada en el agua clorada de la red y en la destilada,

no existiendo, sin embargo, diferencia de crecimiento entre estas últimas, todo ello en las dos formas del germen para un p-Valor de ANOVA $<.0001$.

Los cambios que el sistema API pone de manifiesto son moderados y demuestran globalmente escasos cambios enzimáticos en la forma ATCC del germen donde han oscilado la Esterasa Lipasa y la Cistina Arilamidasa; en la forma de Aislado Clínico han disminuido la Fosfatasa Ácida y α -Glucosidasa. Las aguas de control han determinado también disminución de las Fosfatasas y de la α -Glucosidasa para ambas formas del germen.

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

En el agua carbogaseosa la forma de germen ATCC ha presentado un perfil en dientes de sierra; en un primer momento se observa un ligero crecimiento del inóculo que cede en la segunda hora a partir de la cual de nuevo se reanuda una ligera multiplicación aunque menor que la anterior para finalizar con una inhibición que redujo el inóculo en 0,16 unidades logarítmicas lo que supone una diferencia respecto al crecimiento del inóculo en el medio nutritivo de 1,38 unidades logarítmicas. En el agua destilada presentó inhibición progresiva por la que el inóculo se redujo a las veinticuatro horas en un 92,74%. En el agua de la red mantuvo una sobrevivencia en meseta sin incremento del inóculo hasta la segunda hora en el que inició su inhibición determinando una reducción del 96,06%.

El germen de Aislado Clínico se perfila en meseta, tras una levísima multiplicación en el agua mineromedicinal llegando finalmente a incrementar el inóculo en 0,17 unidades logarítmicas lo que supone una diferencia de 1,09 unidades logarítmicas respecto al crecimiento del germen en el caldo nutritivo. En el agua destilada, tras un insignificante incremento inicial, el germen se

inhibió progresivamente y en la de la red el inóculo que se multiplicó algo más que en el agua mineromedicinal manteniéndose en meseta hasta la tercera hora siendo la reducción final de aquel de un 86,31% y 52,08% respectivamente.

Vegetatividad del *E. coli* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|-------|--------------------|---------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | Inóculo Inicial= | | Inóculo Inicial= | |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,22 | | -1,26 | |
| Ag. C. G. (1) | 0,16 | 30,11 | - 0,17 | - 46,51 |
| Ag. Destilada (2) | 1,14 | 92,74 | 0,86 | 86,31 |
| Ag. Red (3) | 1,40 | 96,06 | 0,32 | 52,08 |

La media (μ) de crecimiento del *E. coli* ATCC en el agua C.G. durante la 1ª hora de exposición no ha presentado diferencia significativa, para este número de experimentos, respecto al crecimiento en el medio nutritivo; en las 2ª, 3ª y 24 horas si muestra ya diferencias significativas de crecimiento entre dicha agua mineromedicinal y en el caldo nutritivo tanto en dicha forma ATCC como en el germen de Aislado Clínico.

Aunque el germen ATCC, salvo en la 2ª hora de exposición, muestra diferencia significativa respecto a su crecimiento en el agua C.G. y las aguas de control, el germen de Aislado Clínico no presenta esas diferencias significativas de sobrevivencia entre el agua mineromedicinal y las de control, para este número de experimentos, durante toda la exposición hasta alcanzar las 24 horas para un p-Valor de ANOVA de <.0001 y 0.0003 respectivamente.

Los cambios enzimáticos han sido de moderados a altos provocando el agua carbogaseosa disminución de distintas enzimas tales como la Fosfatasa Ácida,

Esterasa, β -galactosidasa y en ambas formas del germen, ocasionando el agua destilada reacciones muy semejantes para dichas enzimas, mientras que el agua de la red junto a lo anterior presenta aumento de la Leucina Arilamidasa.

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

El germen ATCC en el agua carbogaseosa mantuvo un nivel de sobrevivencia en meseta, salvo una ligera inhibición a las dos horas que se repitió al final del experimento; en este momento el inóculo inicial se había reducido 0,20 unidades logarítmicas diferenciándose asimismo en 1,16 unidades logarítmicas respecto al crecimiento que alcanzó en el caldo nutritivo. La reducción en el agua destilada fue de 87,99% y en el agua de la red 82,17%.

En el caso del germen Aislado se observa una notable multiplicación hasta la primera hora a partir de la que ésta se corrige hasta el nivel del inóculo sobreviviendo en meseta hasta la tercera hora en la que se inicia su inhibición. Al final del experimento el número de gérmenes se redujo hasta la cifra el inóculo inicial, la diferencia con el crecimiento en el caldo nutritivo fue de 0,95 unidades logarítmicas y la reducción en el agua destilada y la de la red, en las que presentó un perfil de inhibición, fue del 86,09% y 78,55%.

Vegetatividad de la *Ps. aeruginosa* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|-------|--------------------|--------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| Inóculo Inicial= | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -0,96 | | -0,96 | |
| Ag. C. G. (1) | 0,20 | 36,83 | - 0,01 | - 1,25 |
| Ag. Destilada (2) | 0,92 | 87,99 | 0,86 | 86,09 |
| Ag. Red (3) | 0,75 | 82,17 | 0,67 | 78,55 |

La media (μ) de crecimiento de la *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico alcanzado en el medio nutritivo muestra diferencia significativa con el obtenido en el agua CRB. en todas las horas de exposición, no existiendo diferencia significativa, en este número de experimentos entre la multiplicación en el agua CRB. y las aguas de control en las dos primeras horas de exposición para el germen ATCC y si en la 3ª y 24 horas. Sin embargo, en el germen de Aislado Clínico se presentan diferencias significativas en todas las horas de exposición entre la media de crecimiento en el agua CRB. y las de control, para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

El número de cambios enzimáticos es moderado a alto y tienden al aumento del nivel de la Lipasa, Leucina Arilamidasa y Esterasa Lipasa en las dos formas del germen expuesto al agua carbogaseosa, mientras que en las aguas de control sobre todo en el agua de la red se observa disminución en la forma ATCC de la *Ps. aeruginosa* para Esterasa, Lipasa, Leucina Arilamidasa y Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, y en la de Aislado Clínico asimismo disminuyen dichas enzimas así como la Fosfatasa Ácida.

D) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

En el agua carbogaseosa la *L. pneumophila* presentó un perfil de multiplicación en las primeras cuarenta y ocho horas tras las cuales mostró una inhibición incrementado el inóculo en 0,36 unidades logarítmicas lo cual determinó una diferencia de 1,28 unidades logarítmicas frente al crecimiento en su medio nutritivo. En el agua destilada, el perfil fue muy semejante aunque la inhibición a partir de las cuarenta y ocho horas fue mayor mostrando tan solo un incremento de 0,09 unidades logarítmicas que se corresponden con el 23,12 % de reducción final; en ambos casos la exposición a dichas aguas determinó una

pérdida de la inmunofluorescencia del microorganismo. En el agua de la red el cloro inhibió por completo a los gérmenes en las primeras horas estudiadas.

Vegetatividad de la *L. pneumophila* mediada su exposición a las aguas

SG1

| | Unidad Logarítmica | % |
|--------------------------------|--------------------|----------|
| Inóculo Inicial= | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,64 | |
| Ag. C. G. (1) | - 0,36 | - 127,69 |
| Ag. Destilada (2) | - 0,09 | - 23,12 |
| Ag. Red (3) | 0 | 0 |

La media (μ) de crecimiento de la *Legionella pneumophila* en el medio nutritivo ha presentado diferencia significativa respecto al alcanzado en en agua CRB. durante toda la exposición, no existiendo dicha diferencia, para este número de experimentos entre el crecimiento del germen en el agua mineromedicinal y en la destilada de control para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

- VEGETATIVIDAD AGUA OLIGOMINERAL BICARBONATADA MIXTA (OLIG.)

A) *Staphylococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de este microorganismo en el agua oligomineral bicarbonatada mixta se multiplicó durante la primera hora aumentando el inóculo en casi media unidad logarítmica, seguidamente inició una progresiva inhibición que a las veinticuatro horas logró igualar el número de gérmenes al del inóculo inicial, consiguiendo diferenciarse respecto al crecimiento en el caldo nutritivo en 1,95

unidades logarítmicas. En el agua de la red el perfil de crecimiento ha sido parecido al presentado en el agua mineromedicinal, aunque en este caso la suave inhibición iniciada a partir de la primera hora se acentuó tras la tercera obteniéndose al finalizar el experimento una reducción del 91,24%. En el agua destilada la inhibición presentada desde el inicio determinó una reducción del 88,92%.

El germen del Aislado Clínico también se multiplicó en la primera hora para a continuación inhibirse, sobrevivir y finalmente reducir el inóculo en 0,31 unidades logarítmicas, lo cual diferencia el crecimiento en el agua mineromedicinal respecto al crecimiento en el medio nutritivo en 2,45 unidades logarítmicas. En el agua de la red ha presentado inhibición desde el principio para finalizar con menos de 1,19 unidades logarítmicas en relación con el inóculo que supone un 93,58% de reducción, siendo ésta en el agua destilada de 93,55%.

Vegetatividad del *S. aureus* Coag. (+) a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| Inóculo Inicial= | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,96 | | -2,14 | |
| Ag. Oligom.Bicarb.Mixt. (1) | -0,01 | -3,05 | 0,31 | 51,47 |
| Ag. Destilada (2) | 0,96 | 88,92 | 1,19 | 93,55 |
| Ag. Red (3) | 1,06 | 91,24 | 1,19 | 93,58 |

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* Coagulasa (+) y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha mostrado diferencia significativa en todas las horas de exposición respecto al crecimiento alcanzado en el agua OLIG. en ella, la sobrevivencia ha sido semejante para ambas formas del germen que ha tendido

finalmente a la inhibición, sin embargo, en la forma ATCC durante las tres primeras horas no se han mostrado diferencias de crecimiento, para este número de experimentos, en el agua mineromedicinal y en el agua clorada de la red mientras que en el germen de Aislado Clínico, durante toda la exposición, si se han mostrado diferencias significativas de crecimiento que fue mayor en el agua OLIG. para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

Los cambios enzimáticos han sido escasos en la forma ATCC en la que ha disminuido la Esterasa Lipasa en el agua Oligomineral Bicarbonatada Mixta, y moderados en el germen de Aislado Clínico en el que el cambio afectó a la Leucina Arilamidasa, Fosfatasa Ácida y α -Glucosidasa en ambos tendieron a disminuir siendo esto mas acentuado tras la exposición al agua de la red en particular las Fosfatasas y Leucina Arilamidasa esta última en el germen de Aislado Clínico; en el agua de la red también este germen disminuyó las Fosfatasas, α -Glucosidasa, Esterasa Lipasa esta en ambas formas del germen, habiendo sido en las aguas de control la reducción de los gérmenes mayor.

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

El microorganismo ATCC ha presentado en el agua oligomineral un perfil en diente de sierra plano que demuestra un ligerísimo crecimiento seguido de inhibición los cuales se repiten para finalizar igualando el número de gérmenes inoculados. La diferencia con el crecimiento en el caldo nutritivo ha sido de 1,15 unidades logarítmicas. En el agua de la red solamente a partir de la segunda hora, se estableció una progresiva inhibición que redujo el inóculo al final en 0,36 unidades logarítmicas lo cual supone una reducción del 56,20% ,que en el agua destilada fue de 92,74%.

El germen de Aislado Clínico ha mostrado un intenso crecimiento durante la primera hora en la que casi se iguala con el que tuvo lugar en el medio nutritivo, pero a partir de ella se inhibió progresivamente para finalizar con una reducción del inóculo en 0,12 unidades logarítmicas y una diferencia con el crecimiento en ese momento en el caldo nutritivo de 1,38 unidades logarítmicas. En el agua de la red la inhibición estuvo presente desde el principio lográndose una reducción del inóculo del 93,87%, mientras que en el agua destilada la reducción fue del 86,31%.

Vegetatividad del *E. coli* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|---------|--------------------|-------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| Inóculo Inicial= | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,22 | | -1,26 | |
| Ag. Oligom.Bicarb.Mixt. (1) | - 0,07 | - 16,94 | 0,12 | 24,73 |
| Ag. Destilada (2) | 1,14 | 92,74 | 0,86 | 86,31 |
| Ag. Red (3) | 0,36 | 56,20 | 1,21 | 93,87 |

La media (μ) de crecimiento del *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha sido superior y muestra diferencias significativas con el crecimiento en el agua OLIG. durante toda la exposición salvo en 1ª hora de la forma de Aislado Clínico, en esta forma del germen, su crecimiento en el agua mineromedicinal ha sido también superior y con diferencias significativas respecto a las aguas de control en todas las horas. El germen ATCC ha mostrado un crecimiento menor al del Aislado Clínico pero sin diferencia significativa, para este número de experimentos, respecto al crecimiento logrado en las aguas de control durante las dos primeras horas de exposición para un p-Valor del ANOVA de $<.0001$.

La dotación enzimática se ha reducido mas en la forma ATCC en la que ha disminuido las Fosfatasas así como el Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, que en la cepa salvaje donde además de disminuir la Fosfatasa Alcalina disminuye la Esterasa, la β -galactosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa, aumentando solamente la Leucina Arilamidasa, en las aguas de control donde el tipo de cambios ha sido equivalente.

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

La forma ATCC en este agua oligomineral presentó durante las dos primeras horas un perfil de sobrevivencia y seguidamente una clara inhibición que redujo el inóculo en 0,56 unidades logarítmicas logrando así una diferencia respecto al crecimiento en el medio nutritivo de 1,52 unidades logarítmicas. En el agua de la red tras una notable inhibición hasta la segunda hora, se mantuvo en meseta reduciéndose finalmente, no obstante en 89,78%. En el agua destilada la reducción fue del 87,99%.

El germen de Aislado Clínico fue más resistente que el anterior en el agua oligomineral bicarbonatada mixta, pues se multiplicó durante la primera hora incrementando el inóculo en casi media unidad logarítmica, a partir de ese momento presentó una ligera inhibición que se acentuó tras la tercera hora y redujo el inóculo en 0,24 unidades logarítmicas al final del experimento, por todo esto la diferencia respecto al crecimiento de aquel en el caldo nutritivo fue de 1,20 unidades logarítmicas. En el agua de la red el crecimiento del germen fue igual que en el agua mineromedicinal durante las dos primeras horas, a partir de las que se inhibió progresivamente hasta alcanzar una reducción del 82,44%. En el agua destilada la reducción fue del 86,09%.

Vegetatividad de la *Ps. aeruginosa* a las 24 horas de exposición a las aguas

| | ATCC | | Aislad. Clin. | |
|--------------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| Inóculo Inicial= | 5,97 | | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -0,96 | | -0,96 | |
| Ag. Oligom.Biarb.Mixt. (1) | 0,56 | 72,22 | 0,24 | 42,42 |
| Ag. Destilada (2) | 0,92 | 87,99 | 0,86 | 86,09 |
| Ag. Red (3) | 0,99 | 89,78 | 0,76 | 82,44 |

La media (μ) de crecimiento de la *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha mostrado diferencias significativas con el alcanzado en el agua OLIG. en todos los tiempos de exposición y asimismo, la forma ATCC, en cuanto a su crecimiento en esta agua mineromedicinal respecto al alcanzado en las aguas de control. En el germen de Aislado Clínico se observa mayor multiplicación en el agua OLIG. que en su otra forma y no muestra un crecimiento con diferencia significativa durante las tres primeras horas de exposición respecto al presentado en el agua de la red, para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

Sobre la dotación enzimática de ambos tipos de germen el efecto del agua Oligomineral Bicarbonatada Mixta ha hecho descender la Esterasa, Lipasa, y Leucina Arilamidasa; por su parte las aguas de control determinaron también disminución de dichas enzimas excepto la Esterasa lipasa que aumentó en la forma ATCC expuesta al agua de la red, siendo semejantes estos cambios en el agua destilada.

D) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

Tras un crecimiento de casi media unidad logarítmica en este agua oligomineral bicarbonatada mixta en las primeras cuarenta y ocho horas, el germen presentó una progresiva inhibición marcando con ella una diferencia de 1,32 unidades logarítmicas respecto al crecimiento en su medio nutritivo. Al final del experimento el inóculo se había incrementado en el agua mineromedicinal en 0,32 unidades logarítmicas. En el agua destilada su multiplicación y sobrevivencia fue muy semejante aunque la reducción en ella logró casi igualar el inóculo al final del experimento. En el agua de la red la inhibición fue total ya en la primera hora. También la exposición del germen a estas aguas ha determinado la pérdida de su característica inmunofluorescencia.

Vegetatividad de la *L. pneumophila* mediada su exposición a las aguas

SG1

| | Unidad Logarítmica | % |
|--------------------------------|--------------------|----------|
| Inóculo Inicial= | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,64 | |
| Ag. Oligom. Bicarb. Mixt (1) | - 0,32 | - 109,41 |
| Ag. Destilada (2) | - 0,09 | - 23,12 |
| Ag. Red (3) | 0 | 0 |

La media (μ) de crecimiento de la *Legionella pneumophila* en el medio nutritivo ha mostrado diferencia significativa en todos los tiempos de exposición con el alcanzado en el agua OLIG. no existiendo esa diferencia, para este número de experimentos, respecto al crecimiento en el agua destilada para un p-Valor de ANOVA de 0.0007 (en las primeras 48 horas) y $<.0001$ para las demás.

- VEGETATIVIDAD EN AGUA RADIATIVA (RAD.)
- BALNEARIO DE ALANGE-

A) *Stafilococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

La curva de crecimiento del *S. aureus* coagulasa (+) ATCC en el agua radiactiva, para el mismo inóculo que en el medio nutritivo, presenta como en aquel un patrón de crecimiento de los gérmenes, pero con un perfil claramente distinto, ya que superada la primera hora de multiplicación ésta ha dado paso a un progresivo descenso, habiéndose reducido el inóculo en 0,64 unidades logarítmicas respecto a su cifra inicial, lo cual determina una diferencia de 2,60 unidades logarítmicas frente a su incremento en el caldo nutritivo.

En cuanto a las curvas de crecimiento en el agua destilada y en la de la red, éste ha sido semejante en ambas, presentándose un porcentaje de reducción del inóculo inicial de 88,92% y 95,46% respectivamente.

El perfil de la curva del *Staphylococcus aureus* de Aislado Clínico en el agua radioactiva, nos muestra menor nivel de multiplicación que en la forma ATCC en todos los tiempos estudiados, reduciéndose en este agua el inóculo inicial en 0,32 unidades logarítmicas el porcentaje de reducción de dicho inóculo ha sido inferior en esta forma del germen y su diferencia final con el crecimiento en el medio nutritivo ha sido de 2,46 unidades logarítmicas.

En este caso, la curva de crecimiento del germen inoculado en el agua de la red demuestra que también en ella el germen se ha multiplicado ligeramente durante la primera hora de exposición, a partir de la cual su inhibición fue progresiva hasta lograr ya a las veinticuatro horas una reducción del inóculo en un 64,07% . En el agua destilada la reducción fue de 93,55% .

Vegetatividad del *S. aureus* a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|-------|--------------------|-------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -1,96 | | -2,14 | |
| Ag. Rad. (1) | 0,64 | 76,92 | 0,32 | 52,08 |
| Ag. Destilada (2) | 0,96 | 88,92 | 1,19 | 93,55 |
| Ag. Red (3) | 1,34 | 95,46 | 0,44 | 64,07 |

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* Coagulasa (+) ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha sido superior que en el agua RAD. mostrando, con el alcanzado en ella, diferencia significativa durante todas las horas de exposición.

Asimismo, estas dos formas del germen no han presentado diferencia significativa de crecimiento en el agua RAD. respecto al logrado en las aguas de control, prácticamente a lo largo de toda la exposición, para este número de experimentos, habiéndose presentado, sin embargo, significativa la diferencia de crecimiento en estas dos últimas aguas respecto al alcanzado en el agua destilada, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

En cuanto al efecto que el agua radiactiva tiene en las enzimas de ambos tipos de gérmenes ha resultado, como puede apreciarse en la tabla correspondiente, que el *Staphylococcus* ATCC ha presentado cambios enzimáticos, particularmente en las Fosfatasas, así como en la Esterasa Lipasa y α -Glucosidasa. Por su parte el germen del Aislado Clínico muestra un de cambios enzimáticos en el sentido de pérdida de enzimas tales como la Leucina Arilamidasa y α -Glucosidasa, y aumento de la Esterasa Lipasa. El agua de la red y el agua destilada ha provocado menos cambios enzimáticos en el germen ATCC, aunque sí han disminuido en particular en las Fosfatasas, que el agua

radiactiva, mientras que en el germen Aislado el agua destilada ha producido más cambios sobre las Fosfatasas, la Esterasa Lipasa y α -Glucosidasa.

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

En el agua radiactiva, el *E. coli* ATCC muestra multiplicación en la primera hora siendo inferior el perfil de su curva, no obstante, a la que presenta en el medio nutritivo durante ella. A partir de la segunda hora, es evidente una progresiva inhibición hasta el final del experimento en el que el inóculo inicial se ha reducido en 0,66 unidades logarítmicas que determinan una distancia de 1,91 unidades logarítmicas respecto al crecimiento en el medio nutritivo.

A diferencia de lo que ocurre en el agua radiactiva, el agua destilada y el agua clorada de la red produjeron inhibición progresiva desde la primera hora mostrando una reducción del inóculo a las veinticuatro horas de 92,74% y 87,67% respectivamente.

Frente al comportamiento de la forma ATCC, el Aislado Clínico de este microorganismo ha presentado una inhibición progresiva en el agua radiactiva desde el inicio de la exposición logrando una reducción del correspondiente inóculo en 1,02 unidades logarítmicas y una diferencia a su vez de 2,28 unidades logarítmicas respecto al crecimiento en el medio nutritivo siendo estos resultados mejores aún que en el agua destilada. Los perfiles del desarrollo del germen en el agua clorada y en la destilada son también de inhibición desde el principio con una reducción del inóculo de 96,85% y 86,31% respectivamente.

Vegetatividad del *E. coli* a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|-------|--------------------|-------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -1,25 | | -1,26 | |
| Ag. Rad. (1) | 0,66 | 77,96 | 1,02 | 90,50 |
| Ag. Destilada (2) | 1,14 | 92,74 | 0,86 | 86,31 |
| Ag. Red (3) | 0,91 | 87,67 | 1,50 | 96,85 |

La media (μ) de crecimiento en el medio nutritivo del *E. coli* ATCC y de Aislado Clínico ha mostrado diferencia significativa durante toda la exposición con el crecimiento alcanzado en el agua RAD., no habiéndose presentado esas diferencias significativas entre el crecimiento en dicha agua mineromedicinal y las aguas de control para las dos formas del germen. En caso del germen de Aislado Clínico sorprende un crecimiento ligeramente mayor en el agua destilada respecto a las demás a lo largo de la exposición no habiéndose mostrado diferencias todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

Los cambios enzimáticos producidos por el agua radiactiva en el *E. Coli* ATCC han aumentado la Esterasa Lipasa, Fosfatasa Ácida β -galactosidasa y Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa; en la forma de Aislado Clínico ha disminuido la Leucina Arilamidasa y β -galactosidasa aumentando la N-acetil- β -glucosaminidasa. El agua de la red ha disminuido la mayoría de estas enzimas en ambas formas del germen excepto la Leucina Arilamidasa que aumenta en la forma de Aislado Clínico. El agua destilada incrementó la fosfatasa alcalina del germen ATCC y la Leucina Arilamidasa del Aislado Clínico del *E. coli*

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

La *Ps. aeruginosa* ATCC inoculada en el agua radiactiva, inicialmente se multiplica ligerísimamente en la primera hora, mostrando notable diferencia con su perfil de crecimiento con el caldo nutritivo. Desde ese momento se inhibe progresivamente reduciéndose el inóculo inicial en 0,56 unidades logarítmicas que suponen a su vez una diferencia con el crecimiento en el medio nutritivo de 1,52 unidades logarítmicas. En el agua destilada el comportamiento ha sido muy parecido pero la inhibición a las veinticuatro horas fue del 87,99% . La curva en el agua clorada, demuestra una reducción progresiva del inóculo desde su siembra, siendo marcada a partir de la tercera hora, y alcanzando una inhibición del 93,55% .

La *Ps. aeruginosa* del Aislado Clínico a diferencia de la anterior, ha presentado en el agua radiactiva durante todos los momentos de la exposición, un perfil de sobrevivencia de los gérmenes aunque desde el inicio se redujo ligeramente la cantidad inoculada, reduciéndose a las veinticuatro horas en 0,22 unidades logarítmicas el inóculo y presentando asimismo una diferencia de 1,18 unidades logarítmicas frente al crecimiento en el caldo nutritivo. En el agua destilada, cuando se superó la primera hora en la que ya se había reducido algo el inóculo, la inhibición continuó progresivamente hasta llegar a un 86,09% de la inicial. Frente a estos perfiles, en el agua clorada la *P. aeruginosa* del Aislado se ha reducido mas que en las anteriores desde el primer momento alcanzando a las veinticuatro horas una inhibición del 68,10% .

Vegetatividad de la *Ps. aeruginosa* a las 24 horas de exposición a las aguas

| ATCC | | | Aislad. Clin. | |
|--|--------------------|-------|--------------------|-------|
| Inóculo Inicial= RII=Reducción Inóculo Inicial= | Unidad Logarítmica | % | Unidad Logarítmica | % |
| | 5,97 | | 5,97 | |
| | -0,96 | | -0,96 | |
| Ag. Rad. (1) | 0,56 | 72,46 | 0,22 | 39,25 |
| Ag. Destilada (2) | 0,92 | 87,99 | 0,86 | 86,09 |
| Ag. Red (3) | 1,19 | 93,55 | 0,50 | 68,10 |

La media (μ) de crecimiento de la *Ps. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha mostrado diferencias significativas durante toda la exposición con el crecimiento alcanzado en el agua RAD. no existiendo diferencias respecto al crecimiento en dicha agua y el logrado en las aguas de control para ambas formas del germen, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

En cuanto a los enzimas, el agua radiactiva determinó cambios en el sentido de aumento en la Esterasa Lipasa, Lipasa, Leucina Arilamidasa y solo disminución en Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa en la *P. aeruginosa* ATCC. En la *Ps. aeruginosa* del Aislado Clínico han disminuido también las mismas enzimas excepto la Leucina Arilamidasa. Las aguas de control han provocado disminución de las enzimas en ambos tipos de gérmenes excepto en el agua de la red para la forma ATCC en la que ha aumentado la Esterasa Lipasa.

E) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

Una vez inoculada la *L. pneumophila* en el agua radiactiva para valorar el perfil de su crecimiento, encontramos que el germen se siguió multiplicando, aunque con menor nivel que en su medio nutritivo, durante las primeras

cuarenta y ocho horas, tras las que, a diferencia de en aquel, redujo su multiplicación manteniendo un progresivo descenso hasta pasadas las ciento veinte horas de observación que como mínimo se efectuó, al final de dicha observación el incremento sobre el inóculo fue de 0,26 unidades logarítmicas que marca una diferencia de 1,38 unidades logarítmicas frente al crecimiento en su medio nutritivo. En el agua destilada el perfil es casi idéntico al que presentó en el agua radiactiva aunque en este caso el inóculo inicial se redujo en 0,09 unidades logarítmicas. Los porcentajes de reducción en ambas aguas fueron de 83,06% y 23,12% respectivamente frente al 100% de reducción del inóculo que tuvo lugar en el agua de la red ya en las primeras horas de la exposición.

Este germen conservó tras la exposición su reacción característica de hidrólisis del hipurato y la positividad de la oxidasa perdiendo sin embargo la positividad en la inmunofluorescencia inicial.

Crecimiento *L. pneumophila* mediada su exposición las aguas

SG1

| | Unidad Logarítmica | % |
|--------------------------------|--------------------|---------|
| Inóculo Inicial= | 5,97 | |
| RII=Reducción Inóculo Inicial= | -1,64 | |
| Ag. Rad. (1) | - 0,26 | - 83,06 |
| Ag. Destilada (2) | - 0,09 | - 23,12 |
| Ag. Red (3) | 0 | 0 |

La media (μ) de crecimiento de la *Legionella pneumophila* del serogrupo 1 en el medio nutritivo ha mostrado diferencias significativas respecto al alcanzado en el agua RAD. pero para este número de experimentos no han existido diferencias entre dicho crecimiento en el agua mineromedicinal y el logrado en el agua destilada para un p-Valor de ANOVA de <.0001 .

- VALORACIÓN CONJUNTA DE LA VEGETATIVIDAD DE LOS DIFERENTES GÉRMENES DEL ESTUDIO EN LAS AGUAS AQUÍ INVESTIGADAS

A) *Staphylococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

Considerada de manera conjunta la vegetatividad del *S. aureus*, en su forma ATCC se observa que se multiplica, salvo en el agua destilada, que se inhibe progresivamente desde el principio, y puede sobrevivir sin diferencia significativa entre sí, en todas las aguas mineromedicinales investigadas, así como en el agua clorada de la red aunque en ésta última solo durante la primera hora, tras la que se inhibe progresivamente. No obstante, se logra en las aguas mineromedicinales que al final del experimento el inóculo inicial haya aumentado en promedio solamente 0,23 unidades logarítmicas, distando asimismo un promedio de 1,73 unidades logarítmicas a las veinticuatro horas respecto a su crecimiento en el caldo nutritivo frente a las 2,92 y 3,03 unidades logarítmicas que distan del crecimiento en dicho caldo el agua destilada y el agua de la red respectivamente.

El germen de Aislado Clínico tiene un comportamiento equivalente al anterior pero es más vulnerable que aquel en las aguas mineromedicinales, ya que tras una ligera multiplicación, incluso en el agua clorada de la red durante la primera hora, presenta una progresiva inhibición en todas, salvo en el agua bicarbonatada sódica donde dicha multiplicación se mantiene hasta la segunda hora, para finalmente presentarse un promedio de disminución del inóculo en 0,006 unidades logarítmicas y una distancia promedio también del crecimiento final del germen en el caldo nutritivo de 2,14 unidades logarítmicas siendo de 3,33 y 3,23 unidades logarítmicas respectivamente en el agua destilada y en el agua de la red.

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* Coagulasa (+) ATCC en el medio nutritivo ha sido superior, y ha mostrado diferencias significativas, respecto al alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición. Durante la 1ª hora destaca su multiplicación en el agua B.S. habiendo sido progresivamente menor en las aguas RAD., OLG., S.S.H., ag. red. y CRB., e inhibiéndose ligeramente en el ag. dest.; en la 2ª hora de exposición el germen redujo su multiplicación anterior prácticamente en todas las aguas aunque solo en las de control se inhibió por debajo del inóculo inicial; en la 2ª y 3ª hora el *S. aureus* se recupera e incluso se multiplica en las aguas S.S.H. y CRB. manteniéndose la inhibición progresiva en las demás aguas mineromedicinales en las cuales ya a las 24 horas el germen está cercano, en casi todas, a la cifra del inóculo inicial, habiéndose reducido de forma notable dicho inóculo desde la 3ª hora en las aguas de control, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

La media (μ) de crecimiento del *S. aureus* de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha sido superior y ha mostrado diferencias significativas respecto al crecimiento alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición. Durante la 1ª hora, destaca su multiplicación también en el agua B.S. habiendo sido progresivamente menor en las aguas RAD., OLIG., S.S.H., CRB. y agua de la red, e inhibiéndose ligeramente también en el agua dest.; en la 2ª hora el germen redujo su multiplicación anterior prácticamente en todas las aguas aunque solo en las de control se inhibió por debajo del inóculo inicial, por otra parte, en la 2ª horas el germen se recuperó ligerísimamente en el agua B.S. y en la 3ª hora en el agua CRB.; a las 24 horas se mantiene la reducción progresiva en todas las aguas logrando inhibir a este *S. aureus*, por debajo del inóculo inicial, las aguas C.RB, OLIG. y notablemente más las aguas de control, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

B) *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Aislado Clínico

Valorando conjuntamente el comportamiento de la forma ATCC del *E. coli* en las aguas mineromedicinales de la experimentación, se observa que, salvo en el agua sulfatado-sódica hipertónica en la cual se inhibe desde el principio aunque algo menos que en la destilada, el germen se multiplica ligeramente durante la primera hora de exposición a la que sigue una progresiva reducción para finalizar con un promedio de inhibición del inóculo inicial de 0,17 unidades logarítmicas lo que supone una diferencia respecto al crecimiento del germen en el caldo nutritivo de 1,39 unidades logarítmicas frente a las 2,36 y 2,62 unidades logarítmicas de diferencia que presenta en el agua destilada y en la de la red según dicho orden.

La forma de Aislado Clínico del *E. coli*, excepto en el agua radiactiva y en la de la red donde se inhibe progresivamente desde el comienzo del experimento, muestra una ligera multiplicación durante la primera hora incluso en el agua destilada, así como un perfil de sobrevivencia que finalmente cambia a reducción a las veinticuatro horas hasta lograrse en el conjunto de las aguas mineromedicinales una inhibición promedio del inóculo inicial en 0,14 unidades logarítmicas y también una diferencia promedio respecto al crecimiento del germen en el medio nutritivo de 1,40 unidades logarítmicas; en las aguas destilada y de la red, la inhibición determinó una diferencia respecto al crecimiento en el caldo nutritivo de 2,12 y 2,47 unidades logarítmicas respectivamente.

La media (μ) de crecimiento del *E. coli* ATCC en el medio nutritivo ha sido superior, y ha mostrado diferencias significativas, respecto al alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición excepto en el agua B.S. durante la 1ª hora ya que en dicha

agua, en ese periodo, los gérmenes se han multiplicado algo más que en el medio nutritivo; asimismo durante la 1ª hora, aunque ya inferior al medio nutritivo, ha presentado multiplicación aunque progresivamente menor en las aguas CRB., y OLG., e incluso ya inferior al inóculo en las aguas S.S.H. y aguas de control; en la 2ª hora de exposición el germen redujo su multiplicación anterior prácticamente en todas las aguas inhibiéndose a un nivel inferior al inóculo inicial en las aguas S.S.H., y aguas de control; en la 3ª hora este *E. coli* se recupera e incluso se multiplica en las aguas OLIG. y CRB. manteniéndose la inhibición progresiva en las demás aguas mineromedicinales, reduciéndose respecto al inóculo inicial en las S.S.H., RAD., y aguas de control; ya en las 24 horas el germen continuó inhibiéndose por debajo del inóculo en las citadas aguas y además en el agua CRB., todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

La media (μ) de crecimiento del *E. coli* de Aislado Clínico en el medio nutritivo durante la 1ª hora, ha sido superior y ha mostrado diferencias significativas respecto al crecimiento alcanzado en las aguas CRB., aguas de control y agua RAD. inhibiéndose en esta última, y ya en este tiempo, por debajo del inóculo inicial; en la 2ª y 3ª horas la media (μ) de crecimiento del germen en el medio nutritivo presentó diferencia significativa con el menor crecimiento alcanzado en todas las aguas mineromedicinales y de control alcanzando un nivel inferior al del inóculo ya en este periodo las aguas de control y el agua RAD.; a las 24 horas se mantiene la reducción progresiva en todas las aguas logrando la inhibición por debajo del inóculo inicial, además de las anteriores el agua OLIG., todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

C) *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de la *Ps. aeruginosa* tras una ligera multiplicación durante la primera hora, salvo en el agua bicarbonatada sódica, así como en la destilada y en la de la red en las que desde el principio de inhibe progresivamente, se redujo al final de la experimentación en las demás aguas mineromedicinales hasta disminuir el inóculo inicial en un promedio de 0,39 unidades logarítmicas alcanzando asimismo una diferencia promedio de 1,35 unidades logarítmicas respecto al crecimiento en el caldo nutritivo; dicha diferencia fue de 1,88 unidades logarítmicas en el agua destilada y de 2,19 unidades logarítmicas en el agua de la red.

En el caso del germen de Aislado Clínico se aprecia multiplicación durante la primera hora salvo en las aguas radiactiva, destilada y de la red, seguida de progresiva inhibición tanto en éstas como en las demás aguas mineromedicinales; el promedio ha alcanzado 0,15 unidades logarítmicas de inhibición del inóculo inicial y una distancia de 1,11 unidades logarítmicas respecto al crecimiento de la *Ps. aeruginosa* en el caldo nutritivo; en las aguas destilada y de la red crecimiento fue 1,82 y 1,69 unidades logarítmicas menor que en el ya citado caldo nutritivo.

La media (μ) de crecimiento de la *Ps.aeruginosa* ATCC en el medio nutritivo ha sido superior, y ha mostrado diferencias significativas, respecto al alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición. Durante la 1ª hora destaca su multiplicación en el agua RAD. habiendo sido progresivamente menor en las aguas S.S.H., OLG., CRB., y aún reduciendo el inóculo inicial las aguas de control y el agua B.S. ; en la 2ª hora de exposición el germen continúa su inhibición progresiva en todas las aguas, logrando reducir ahora también en la CRB. el nivel del inóculo inicial, aunque se recupera en esta agua y en la B.S. ligerísimamente, y siempre

por debajo del inóculo, ya en la 3ª; a las 24 horas la *Ps.aeruginosa* mantiene la inhibición progresiva y su número es inferior en todas las aguas al del inóculo inicial, todo ello para un p-Valor de ANOVA de <.0001 .

La media (μ) de crecimiento de la *Ps. aeruginosa* de Aislado Clínico en el medio nutritivo ha sido superior y ha mostrado diferencias significativas respecto al crecimiento alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición. Durante la 1ª hora, destaca su multiplicación en el agua CRB. habiendo sido progresivamente menor en las aguas OLIG., B.S., y S.S.H., alcanzando un nivel inferior al inóculo inicial ya las aguas de control y la RAD.; en la 2ª hora el germen siguió reduciendo su número en todas las aguas, recuperándose ligeramente en las aguas S.S.H. y OLIG. reduciendo también el inóculo inicial en este periodo el agua B.S.; en la 3ª y 24 horas, tras una ligerísima recuperación en el agua RAD., se mantiene la reducción progresiva en todas las aguas que logran inhibir a esta *Ps. aeruginosa* por debajo del inóculo inicial, salvo el agua S.S.H. aunque está en el límite, todo ello para un p-Valor de ANOVA de <.0001 .

D) *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 cepa Philadelphia

Inoculada la *L. pneumophila* en las aguas del estudio y en las de control puede apreciarse cómo en una de estas últimas, es decir, en el agua de la red presenta una inhibición total desde el primer momento de la exposición; en las aguas mineromedicinales del estudio presentó en todas un perfil de multiplicación de 1 unidad logarítmica en el caso del agua sulfatada-sódica hipertónica, y en torno a media unidad logarítmica en las demás aguas durante las primeras cuarenta y ocho horas. A partir de ese momento el germen inicia una progresiva inhibición que fue mas acentuada en el agua destilada e inmediatamente

después en el agua radiactiva, presentándose al final del experimento un promedio de crecimiento del inóculo inicial de 0,46 unidades logarítmicas lo cual supone una diferencia promedio de 1,18 unidades logarítmicas respecto al crecimiento de la *L. pneumophila* en su medio nutritivo, mientras que en el agua destilada esta diferencia fue de 1,55 unidades logarítmicas.

La media (μ) de crecimiento de la *L. pneumophila* en el medio nutritivo ha sido superior, y ha mostrado diferencias significativas, respecto al alcanzado en cada una de las aguas mineromedicinales utilizadas en este estudio y a lo largo de toda la exposición. En todas las aguas mineromedicinales e incluso en la destilada como agua de control se aprecia en las primeras 48 horas una multiplicación del germen con muy poca diferencia entre las distintas aguas, esta proliferación cesa, se estabiliza hacia las 72 horas y se reduce progresivamente a partir de ellas hasta el final del experimento pero en ningún caso se iguala ni reduce el inóculo inicial, todo ello para un p-Valor de ANOVA de $<.0001$.

II.-Estudio microbiológico de las aguas e instalaciones crenoterápicas del Balneario de Alange

Realizado el estudio microbiológico de las aguas del Balneario según se describe en Material y Método los resultados han sido:

A) ESTUDIO DE LABORATORIO

1) Siembra directa de las aguas del manantial y de las aguas servidas (piscinas):

Sembradas e incubadas veinticuatro horas las placas con agua mineromedicinal, tomada de distintas localizaciones del Balneario y según lo ya descrito, asimismo, en Material y Método tenemos como resultado promedio de las diferentes pruebas:

| | Nº colonias Gram (+) | Nº colonias Gram (-) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Manantial (Fría) | 0 | 0 |
| Lagunas (fría) | 0 | 2 |
| P. templada / Burbujas | 0 | 12 |
| Termas (frías) | 0 | 3 |

Tabla 1

Gérmenes identificados:

Estudiadas con el sistema Enterotube y el sistema API 10 las escasas colonias aisladas en la piscina templada y piscinas frías (Lagunas del Manantial), el germen Gram (-) aislado fue *Providenzia stuartii* y algún otro coliforme, estos gérmenes son en ambos casos no patógenos.

2) Búsqueda de *L. pneumophila* SG 1, de algas y amebas en aguas del manantial, en las aguas servidas (piscinas) y en las instalaciones balneoterápicas:

Tomadas las muestras de agua correspondientes a las cuatro estaciones de un periodo anual, fueron sembradas en su correspondiente medio selectivo y una vez incubadas se procedió a la correspondiente lectura. De forma simultanea se realizó en las citadas muestras de agua el protocolo de examen de algas y amebas tal y como ya se ha descrito para este fin en Material y Método resultando:

| | <i>L.pneumophila</i> SG 1 | Algas | Amebas |
|-------------------------------------|---------------------------|----------|----------|
| Manantial (fría) | Negativo | Negativo | Negativo |
| Lagunas (fría) | Negativo | Negativo | Negativo |
| P. templada / Burbujas | Negativo | Negativo | Negativo |
| Terma (fría) | Negativo | Negativo | Negativo |
| Alcachofas/duchas (raspadas) | Negativo | Negativo | Negativo |
| Grifos (raspado) | Negativo | Negativo | Negativo |
| Toberas/salida de aire (raspado) | Negativo | Negativo | Negativo |

Tabla 2

Tal y como puede verse en la tabla la *L. pneumophila* ha estado AUSENTE en todas las localizaciones estudiadas y asimismo los exámenes del sedimento ya en fresco ya teñido con Giemsa fueron negativos para algas y amebas tal y como consta en la tabla, habiéndose identificado solamente algunas fibras vegetales inocuas en el agua de una de las lagunas del Manantial.

B) ESTUDIO DE CAMPO

1) Filtración por membrana de las aguas manantiales y servidas (piscinas):

| | C. totales | C. fecales | C. totales + C. Blue | Pseudomonas |
|------------------------|------------|------------|----------------------|-------------|
| Manantial | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lagunas | 13 | 7 | 16/1 | 3 |
| P. templada / burbujas | 190 | 80 | 120/12 | 32 |
| Termas | 60 | 15 | 55/3 | 9 |

Tabla 3

En esta tabla se aprecia el resultado promedio tras la filtración de 100cc. de agua procedente de los puntos indicados.

2) Test de enzimoimmunoensayo para la detección de *L. pneumophila* en las aguas e instalaciones hidroterápicas:

| | Verano 1/semana | Otoño 1/semana | Invierno 2/mes | Primavera 2/mes |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Manantial | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| P. templada/ burbujas | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Lagunas | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Termas | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

Tabla 4

3) Test de enzimoimmunoensayo para antigenuria de *L. pneumophila* en personal del balneario:

Recogida la orina en recipiente estéril se procedió a la realización del test según las indicaciones del mismo a un total de 26 personas de entre los empleados que están en contacto habitual con el ambiente y técnicas balneoterápicas siendo su distribución:

Antigenuria de *L. pneumophila*. Personal del balneario

| Personal Explorado | ♀ | ♂ | 20-40 añ. ed. | 41 y + años ed. | 1 a 10 añ. Expos. | 11 y + añ. expos. |
|-----------------------|----|---|---------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| | 20 | 6 | 65% | 35% | 73% | 27% |

Tabla 5

El resultado del test fue NEGATIVO en el 100% de los casos.

DISCUSSION

DISCUSIÓN

I.- Sobre los resultados del estudio experimental realizado con las formas ATCC y de Aislado Clínico de los gérmenes y aguas incluidos en la investigación.

Iniciamos esta discusión para valorar los resultados obtenidos al exponer a cada uno de los gérmenes con las distintas aguas, a partir de las correspondientes curvas de vegetatividad y la consideración de la significancia estadística así como las modificaciones enzimáticas.

No es posible contrastar nuestros resultados con otras investigaciones semejantes, dado que los estudios existentes que hemos encontrado, a propósito de la sobrevivencia de los gérmenes, valoran ésta, no en la forma experimental que aquí planteamos, sino sobre todo, como observación de la evolución de los microorganismos en los medios en los que habitualmente están presentes, lo cual, no obstante, nos permite una primera argumentación para justificar nuestros hallazgos.

Asimismo, aún cuando los resultados de este estudio, en gran medida confirman la hipótesis, hemos de tener en cuenta que la cantidad de gérmenes incluida en los inóculos de la experimentación, o sea, la cantidad estandarizada en microbiología para las curvas de inhibición frente a antibióticos, es una cantidad incomparable con el aporte natural de gérmenes que se hace en la balneación, donde además los gérmenes, al exponerse a los parámetros de cada agua, diferentes, sin duda, a los idóneos para su desarrollo habitual, se alteran, tal y como hemos comprobado en el capítulo de resultados, y como asimismo ocurre cuando se exponen a distintos

medios. Por otra parte, el número de gérmenes que pueden aportarse durante la balneación, es muchísimo menor al que se elimina en un proceso infeccioso, que es el que se ajusta a los citados inóculos que hemos realizado, y además a una dilución claramente mayor^{181 a 184}.

- VALORACIÓN DE CADA GERMEN EN LAS DISTINTAS AGUAS

S. aureus ATCC 25923 y de Aislado clínico en Agua S.S.H.

El *S. aureus* en sus dos formas, tal y como puede verse en la correspondiente curva, aunque en este agua S.S.H. sobrevive y aún se multiplica, a pesar de la riqueza en solutos del agua, no se desarrolla en ella como lo hace en el medio nutritivo donde el inóculo inicial aumenta, ya durante la primera hora, en más de una unidad logarítmica respecto a como lo hace en el agua mineromedicinal. Durante esa primera hora de exposición los gérmenes que sobreviven en el agua no se diferencian significativamente de los que sobreviven en las aguas clorada y destilada. Para este germen, según lo anterior, el agua mineromedicinal no es un medio nutritivo, a pesar de su riqueza en azufre y otros oligoelementos, con efecto trófico, como los que en conjunto este germen puede encontrar en la piel y mucosas que en general coloniza, y su crecimiento en ella en una balneación parece suponer el mismo riesgo que si la balneación se practicara en una piscina con agua clorada en niveles de potabilización.

La ligera multiplicación que presenta en la segunda y tercera hora, que se reduce sin embargo ya a las veinticuatro, demuestra una capacidad adaptativa del germen

al agua pero su multiplicación y por tanto vitalidad es incomparablemente menor a la que muestra en el medio nutritivo

El *S. aureus* Coag. (+) ATCC sobrevive mas facilmente que la forma del germen Aislado Clínico en las aguas S.S.H. y su multiplicación en ellas no difiere significativamente de la que alcanza durante la primera hora para ambas formas del germen en las aguas de control.

Los cambios enzimáticos evidenciados por el sistema API ZYM a la tercera hora de exposición a las aguas mineromedicinal y destilada y clorada de la red como aguas de control demuestran que aunque el germen ha sobrevivido, el descenso de sus enzimas, avisa de que la exposición a dichas aguas es, o le resulta, estresante. Dicho germen ha presentado además un porcentaje global de cambios enzimáticos semejante a los que le ocasiona el agua clorada en el caso de la forma ATCC y un porcentaje ligeramente superior para el Aislado Clínico.

E. coli ATCC 25922 y de Aislado clínico en agua S.S.H.

Aquí la forma *E. coli* ATCC muestra un comportamiento claramente distinto al presentado por la forma de Aislado Clínico. El germen ATCC ya desde la primera hora reduce en $\frac{3}{4}$ de unidad logarítmica el inóculo inicial, reducción que mantiene por debajo de dicho inóculo durante todas las horas de exposición, distinguiéndose significativamente del crecimiento que alcanza en el medio nutritivo y no presentando diferencia significativa con el crecimiento que esta forma ATCC del germen ha mostrado con las aguas de control hasta superar la segunda hora de exposición.

El germen de Aislado Clínico, por el contrario, parece encontrar en el agua S.S.H. y asimismo en el agua clorada de la red una oferta de medio nutritivo, ya que durante

su primera hora de exposición este germen aumenta el número del inóculo inicial en las dos aguas nombradas sin diferencia significativa en relación a como lo aumenta en el medio nutritivo. A partir de esta primera hora aquella multiplicación del inóculo se reduce en ambas aguas, también sin diferencia entre ellas, pero sí con diferencia significativa respecto a su multiplicación en el medio nutritivo.

Para este germen, la balneación asimismo durante más de dos horas en este agua mineromedicinal no aumentaría el riesgo respecto a la balneación en el agua clorada en niveles de potabilización.

Las aguas S.S.H. producen a las dos formas de este microorganismo un porcentaje considerable de cambios enzimáticos que es mayor en la forma de Aislado Clínico que en la de ATCC, apreciándose un aumento del nivel de enzimas en el agua S.S.H. respecto a las aguas de control lo que coincide con sobrevivencia en la primera y mayor inhibición en la segunda.

P. aeruginosa ATCC 27853 y de Aislado clínico en agua S.S.H.

El comportamiento de las dos formas del germen es relativamente parecido en ambos casos y ponen de manifiesto que el agua S.S.H. no le resulta un medio nutritivo, a pesar la fácil sobrevivencia de la *P. aeruginosa* en distintos tipos de agua a nivel ambiental, ya que respecto a su crecimiento en este agua mineromedicinal ha reducido el inóculo inicial en cantidad importante. Durante la primera hora no se han mostrado diferencias significativas en cuanto a su multiplicación en dicha agua y en las aguas de control, por lo que una posible balneación en ella no parece ofrecer más riesgo que la balneación en una piscina clorada.

La disminución de las enzimas que ha presentado este germen en las aguas de control frente a lo que ha ocurrido en el agua mineromedicinal para la forma ATCC explicaría la mayor inhibición que ha tenido en aquellas; la disminución de enzimas del germen Aislado Clínico en las tres aguas estudiadas, nos permite pensar que aunque en la mineromedicinal no se ha inhibido, sin embargo está estresado. La forma del germen Aislado Clínico ha mostrado un porcentaje de cambios enzimáticos debidos al agua de la red respecto próximo a los conseguidos en el agua S.S.H.

Staphilococcus aureus Coag. (+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico en agua B.S.

Las dos formas del *S. aureus* Coag. (+) en este agua han mostrado una reducción del inóculo inicial en la primera hora respecto al crecimiento en el medio nutritivo con diferencias significativas, las cuales se han mantenido para las horas restantes de exposición, sin embargo la media de crecimiento no ha presentado esas diferencias significativas en el agua mineromedicinal y en el agua de control para dicho tiempo en la forma ATCC y para las tres primeras horas en la forma de Aislado Clínico. Vista la equivalente sobrevivencia del inóculo en estos dos tipos de agua, la balneación en la mineromedicinal supone el mismo riesgo que la balneación en una piscina clorada en niveles de potabilización aún cuando hemos de tener en cuenta que los cambios enzimáticos reducen posiblemente el riesgo por el estrés bacteriano que parece el agua determinar.

En efecto, el porcentaje de cambios enzimáticos es de -moderado a alto- en ambas formas del germen siendo mayor en la forma ATCC que en la forma de Aislado Clínico en lo que corresponde al agua B.S., no difiriendo en la práctica de lo que se obtenido al exponerse a las aguas de control.

E. coli ATCC 25922 y de Aislado clínico en agua B.S.

El *E. coli* en sus dos formas ATCC y de Aislado Clínico, no ha mostrado para este número de experimentos diferencias significativas de crecimiento en la 1ª hora en el medio nutritivo en el agua B.S. respecto desarrollo alcanzado en al agua de la red, multiplicándose en todas ellas de forma muy semejante de manera que el inóculo inicial ha aumentado a la vez y por igual a como lo hacia en el medio nutritivo del que ya comienza a diferir a partir de la primera hora momento en el que sigue no obstante sin diferenciar su crecimiento del que alcanza en el agua clorada de la red.

Su inhibición progresiva finaliza igualando a las 24 horas el inóculo inicial. Si estas aguas bicarbonatadas se contaminaran en niveles altos con este germen presentarían durante la primera hora tras la contaminación un riesgo equivalente al que se tendría en una piscina con agua clorada en niveles de potabilización.

El *E. Coli* de Aislado Clínico presenta mayor porcentaje de cambios enzimáticos que la forma ATCC, no difiriendo tampoco en práctica de lo que ocurre para ambas formas en las aguas de control lo cual permite pensar que el nivel de posible estrés del germen al ser semejante en ambos tipos de agua, la mineromedicinal ha logrado parecidos efectos en el germen a los del agua clorada de la red.

P. aeruginosa ATCC 27853 y Aislado Clínico en agua B.S.

La *P. aeruginosa* en su forma ATCC redujo en el agua mineromedicinal el inóculo inicial desde la primera hora en $\frac{1}{4}$ de unidades logarítmicas manteniéndose en esa tendencia con una ligera recuperación hasta las 24 horas, ese mismo perfil es el presentado en las aguas de control sin diferencia significativa con aquella. El Aislado Clínico ha mostrado una tendencia a la inhibición del inóculo salvo en la

primera hora, todo ello también sin diferencia significativa con las aguas de control. Como en las aguas mineromedicinales ya vistas, también en este agua el germen, a pesar de su capacidad para sobrevivir en aguas ambientales, se ha mostrado vulnerable no resultando tampoco el agua B.S. un medio nutritivo para el microorganismo. La balneación en este agua mineromedicinal no parece suponer mas riesgo que la balneación en agua clorada en niveles de potabilización.

Por otra parte la *P. aeruginosa* de Aislado Clínico presenta mayor porcentaje de cambios, enzimáticos en el sentido de disminución de las enzimas disponibles, que la forma ATCC superando a los que presenta en las aguas de control lo cual coincide con mayor inhibición del germen en el agua aunque también sería posible un aumento de las enzimas con resultado de inhibición del germen ya que a veces las enzimas se activan para producir la autólisis.

S. aureus Coag.(+) ATCC 25923 y Aislado Clínico en agua CRB.

Este *S. aureus* ATCC y de Aislado Clínico ha diferido significativamente en cuanto al crecimiento alcanzado en el agua C.G. y el obtenido en su medio nutritivo, manteniendo un nivel de sobrevivencia discreto sin aumentar casi el número de gérmenes del inóculo inicial y con ligera tendencia a la inhibición, la cual fue ya un hecho al acercarse a las 24 horas de exposición para el caso de la forma de Aislado Clínico; el crecimiento de la forma ATCC en el agua mineromedicinal no se ha distinguido del logrado en el agua clorada pero sí ha sido significativamente diferente al respecto a partir de la primera hora para la forma del germen Aislado Clínico. Si este germen estuviera presente durante la balneación en este agua en la primera hora de exposición tampoco representaría mayor riesgo que la balneación en agua clorada en niveles de potabilización.

El porcentaje de cambios enzimáticos presentado por este germen al exponerse al agua mineromedicinal CRB. es muy próximo para sus dos formas entre sí y equivalente al logrado tras su exposición a las aguas de control, teniendo tendencia en todos los casos a la disminución de las enzimas lo cual es coherente con su tendencia a la inhibición en las aguas.

E. coli ATCC 25922 y de Aislado Clínico en agua CRB.

El *E. coli* ha mostrado una notable multiplicación del inóculo inicial en el agua mineromedicinal durante la 1ª hora sobre todo en su forma ATCC que no difirió significativamente del crecimiento logrado en el medio nutritivo, superando a la que logró en las aguas de control aunque se igualó con ellas en la 2ª hora sobreviviendo aunque ya con tendencia a la inhibición en el agua mineromedicinal, pero con mayor nivel que en las citadas aguas de control durante la 3ª y hasta las 24 horas de exposición esto último con una diferencia ya significativa; sin embargo la forma de Aislado Clínico ha mostrado una sobrevivencia equivalente sin diferencia significativa en el agua CRB. y en las aguas de control hasta alcanzar las 24 horas no aumentando su inóculo inicial ni en el agua mineromedicinal ni en las de control a pesar de la tendencia a sobrevivir que presenta este germen en el ambiente y en las aguas hasta ahora vistas de esta investigación. El pH ácido ó límite del agua podría, en este caso, explicar este comportamiento del germen, la balneación en ella si estuviera presente el microorganismo no ofrecería mas riesgo que la balneación en un agua clorada en niveles de potabilización.

El porcentaje de cambios enzimáticos determinados por la exposición al agua mineromedicinal y al agua clorada de la red ha sido semejante para ambas formas del germen, presentado, no obstante, la forma de Aislado Clínico mayor porcentaje de cambios con tendencia a la disminución de las enzimas, lo cual es coherente con

el comportamiento de inhibición ó latenciación que ha presentado en su exposición al agua.

P. aeruginosa ATCC 27853 y Aislado Clínico en agua CRB.

Este germen en su forma ATCC, muestra diferencias significativas de crecimiento en el agua CRB. respecto al alcanzado en el medio nutritivo durante toda la exposición, no presentando dichas diferencias durante las tres primeras horas de la misma en el agua mineromedicinal respecto a sobrevivencia alcanzada en el agua de la red para este número de experimentos, habiéndose mantenido en todas en el nivel del inóculo inicial. En la forma de Aislado Clínico, durante la primera hora el germen ha presentado mayor sobrevivencia y multiplicación del inóculo inicial en nivel próximo al que alcanza en el medio nutritivo pudiéndose decir que las condiciones de esta agua parecen serle favorables, la diferencia significativa de crecimiento durante la primera hora en el agua CRB. y en las aguas de control exigiría durante la balneación una renovación constante del agua para evitar en ella su multiplicación.

En cuanto a los cambios enzimáticos, la forma ATCC del germen ha presentado mayor porcentaje de cambios que la forma de Aislado Clínico, y ambas mayor porcentaje que las aguas de control, siendo en todas en el sentido de aumento de las enzimas. En este caso si observamos la forma ATCC que no ha multiplicado el inóculo, el hecho de que no obstante hayan aumentado sus enzimas al exponerse al agua CRB. podría explicarse como base de su autofagia para sobrevivir en el agua que realmente podría estar vulnerándolo. En la forma de Aislado Clínico el aumento de las enzimas podría responder no solo a su efectiva multiplicación en el agua sinó también a una autofagia del germen ya que pasada la primera hora se inhibe bruscamente manteniéndose en el nivel del inóculo, de cualquier forma el potencial estrés de la bacteria habría que constatarlo.

S. aureus ATCC 25923 y Aislado Clínico en agua OLIG.

Este *S. aureus*, en su forma ATCC durante la primera hora ha multiplicado el inóculo inicial en el agua OLIG. hasta alcanzar casi $\frac{1}{2}$ unidad logarítmica teniendo este mismo comportamiento en el agua clorada de la red respecto al que no ha mostrado diferencia significativa, no obstante ambos crecimientos se han diferenciado significativamente del alcanzado en ese tiempo en el medio nutritivo, una mera sobrevivencia con tendencia a la inhibición e igualación al inóculo inicial al cabo de las 24 horas sin diferencia en el agua mineromedicinal y en la de la red, informan de quede el germen no se desarrolla favorablemente en este agua.

En el comportamiento del Aislado Clínico, salvo en la primera hora se demuestra una tendencia semejante en el agua mineromedicinal pero con diferencia significativa de menor crecimiento en las aguas de control. La balneación en este agua OLIG. si se contaminara con el microorganismo dado que en la primera hora mantiene cierta vegetatividad obligaría a la renovación ó a su frecuente dilución.

El porcentaje de cambios enzimáticos ha sido mayor en la forma de Aislado Clínico que en la forma ATCC en los cuales ha tendido a la disminución de las enzimas lo cual es coherente con su tendencia a la inhibición de ambas formas en el agua mineromedicinal, habiendo sido algo mayor dicha disminución de enzimas tras la exposición del germen a las aguas de control en las que podría haber encontrado la bacteria mayor vulneración.

E. coli ATCC 25922 y Aislado Clínico en agua OLIG.

Las formas del germen ATCC y de Aislado Clínico ha mostrado un crecimiento superior en el medio nutritivo y con diferencias significativas con respecto al alcanzado en el agua OLIG. y asimismo respecto a las de control, salvo en la forma

de Aislado Clínico durante la 1ª hora en la que el número de germen inoculados se multiplicó por igual en el medio nutritivo y en este agua mineromedicinal. Por otra parte la forma ATCC no mostró diferencia de crecimiento en el agua mineromedicinal y en las aguas de control durante las dos primeras horas de exposición para este número de experimentos, sin embargo la de Aislado Clínico sí presentó diferencia significativa de crecimiento entre el agua OLIG. y el agua clorada de la red; La ubicuidad de este germen se muestra una vez más en esta agua que como en las ya vista crece aunque sea tan diferente su composición, en este caso la condición hipotónica del agua podría no obstante haber determinado la inhibición brusca que al cabo de la segunda hora de exposición experimenta el germen dado que el paso del agua a través de las membranas está sobradamente comprobado y pudiendo determinar estallido del germen por atracción del agua a su interior cargado de presión osmótica.

El porcentaje de cambios enzimáticos producidos por el agua OLIG. ha sido superior en la forma de Aislado Clínico respecto al que ha tenido lugar en la forma ATCC y ligerísimamente mayor el que se produjo al enfrentarse a las aguas de control ambas formas del germen, asimismo los cambios han tendido a la disminución de los enzimas lo cual es coherente con la tendencia a la inhibición del germen sobre todo a la tercera hora de exposición.

P. aeruginosa ATCC 27853 y Aislado Clínico en agua OLIG.

La *P. aeruginosa* utilizada en este estudio ha mostrado diferencias significativas de crecimiento en el medio nutritivo donde aumentó hasta una unidad logarítmica en su multiplicación respecto al crecimiento en el agua OLIG. en todos los tiempos de exposición, sobre todo en su forma ATCC, la cual a su vez, mostró diferencia significativa respecto a su crecimiento en las aguas de control; en la forma de Aislado Clínico no han existido diferencias durante las tres primeras horas, para

este número de experimentos, entre la multiplicación del germen en el agua mineromedicinal y la alcanzada en el agua clorada de la red en las cuales multiplicó $\frac{1}{4}$ de unidad logarítmica su inóculo inicial lo que no obstante supone una diferencia significativa de crecimiento también para esta forma del germen respecto a como se multiplica en el medio nutritivo. La condición ubicua y oligotrofa del germen es la que le ha permitido posiblemente sobrevivir por igual en el agua mineromedicinal y en la clorada de la red en las que, no obstante, también se inhibe casi por igual. La balneación en este agua mineromedicinal si estuviera contaminada por este germen no supondría, también en este caso, mayor riesgo que si estuviera clorada en niveles de potabilización con los que sin embargo se alteraría.

El porcentaje de cambios enzimáticos producido por el agua OLIG. ha sido notablemente inferior al determinado por las aguas de control para el germen ATCC y próximo, sin embargo, en el caso del germen de Aislado Clínico siendo para ambos en el sentido de disminución de las enzimas lo cual se corresponde con su tendencia a la inhibición por lo que cabe suponer que la exposición a las aguas le resulta vulnerante.

S. aureus Coag.(+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico en agua RAD.

-Balneario de Alange-

Este germen en su forma ATCC se ha multiplicado ligerísimamente en este agua mineromedicinal durante la primera hora, aunque respecto a su crecimiento en el medio nutritivo mostró diferencia significativa con el alcanzado en aquella en la que a su vez su desarrollo no difirió significativamente con el logrado en las aguas de control; durante el tiempo de exposición restante su tendencia fue a la inhibición lográndose la reducción por debajo del inóculo. El *S. aureus* de Aislado Clínico se comportó de manera semejante con ligera sobrevivencia inhibiéndose finalmente también en este agua RAD. sin diferencia significativa respecto a como lo hizo en

el agua clorada de la red durante toda su exposición frente a la inhibición que mostró desde el principio en el agua destilada, es por lo que la balneación en este agua ofrece un riesgo equivalente a la balneación en agua clorada en niveles de potabilización.

El porcentaje de cambios enzimáticos del germen ATCC ha sido superior en este agua mineromedicinal que en las aguas de control y en el sentido de compensación de la reducción de ciertas enzimas frente al aumento de otras, como son la Esterasa-Lipasa y la α -Glucosidasa no obstante todas implicadas en el metabolismo y mantenimiento de estructuras externas e internas del germen, siendo equivalente el resultado de cambios en el caso del germen de Aislado Clínico.

E. coli ATCC 25922 y de Aislado Clínico en agua RAD.

-Balneario de Alange-

El *E. coli* en su forma ATCC se ha multiplicado como el germen anterior durante la primera hora de forma semejante, aunque ligeramente inferior en el agua RAD., que en el medio nutritivo, a continuación ha iniciado una inhibición que ya en la segunda, tercera y 24 horas ha hecho que se reduzca finalmente en mas de $\frac{3}{4}$ de unidad logarítmica el inóculo inicial en el agua mineromedicinal, siendo la reducción semejante, y sin diferencia significativa, con la presentada en las aguas de control. La forma de Aislado Clínico ha mostrado crecimiento en el medio nutritivo con diferencias significativas respecto al alcanzado en el agua RAD. en la cual este germen ha inhibido el inóculo inicial desde la primera hora hasta reducirlo en una unidad logarítmica a las 24 horas mostrando escasa diferencia con lo ocurrido en el agua clorada de la red solamente a esta última hora de la exposición; este comportamiento permite pensar que la balneación en este agua no parece ofrecer mas riesgo que la balneación en agua clorada en niveles de potabilización.

El porcentaje de cambios enzimáticos del germen ATCC en el agua mineromedicinal y las de control ha sido semejante entre sí, mientras que en el germen de Aislado Clínico el porcentaje de cambios en dichas aguas de control superó al logrado en el agua mineromedicinal, donde la tendencia a la inhibición del germen no se ha correspondido, sin embargo, con una gran tendencia a los cambios enzimáticos aunque estos han sido, sobre todo, en la Leucina Arilamidasa, y β -galactosidasa que tiene funciones de permitir la penetración a través de la pared de elementos para la función de fermentación, es decir, el germen presenta a modo de una “congelación de su actividad metabólica al tiempo que una reducción de su vitalidad” todo ello a pesar de su capacidad de sobrevivir en muchos medios.

P. aeruginosa ATCC 27853 y de Aislado Clínico en agua RAD.

-Balneario de Alange-

La *P. aeruginosa* ATCC y de Aislado Clínico, han presentado un crecimiento en el medio nutritivo con diferencia significativa durante toda la exposición con respecto al alcanzado en el agua RAD. en la cual se ha inhibido el inóculo inicial prácticamente desde la primera hora de exposición sobre todo el Aislado Clínico. En las aguas de control la inhibición ha sido equivalente a la alcanzada que en el agua RAD. para este número de experimentos, la balneación en este agua RAD. no parece ofrecer mas riesgo que la balneación en agua clorada a niveles de potabilización.

El porcentaje de cambios enzimáticos ha sido semejante en el agua mineromedicinal y en las de control para la forma del germen ATCC mientras que dicho porcentaje de cambios fue algo superior en las aguas de control que en el agua RAD. para la forma de Aislado Clínico habiéndose modificado en este caso sobre todo hidrolasas y lipasas que nos hablan de sobrevivencia y función metabólica propiamente dicha del germen.

-VALORACIÓN DE CADA GERMEN EN EL CONJUNTO DE LAS AGUAS

S. aureus Coag.(+) ATCC 25923 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de este germen se ha multiplicado durante la 1ª hora en el conjunto de las aguas mineromedicinales y en el agua clorada de la red sin presentar diferencias significativas entre sí, aunque esta multiplicación ha diferido significativamente con la presentada en el caldo nutritivo, no obstante, donde menos ha crecido en dicho tiempo es en el agua RAD., durante la 2ª hora se aprecia, en general, ya una reducción de la multiplicación manteniendo el germen solo sobrevivencia aunque en las aguas de control ya mostró una reducción respecto al inóculo la cual fue muy acentuada en la 3ª hora y a las 24 horas difiriendo significativamente de la vegetatividad que mantuvo en esas horas en las distintas aguas mineromedicinales, salvo en el agua RAD., que no ha mostrado diferencias con las aguas de control.

El germen de Aislado Clínico ha seguido un comportamiento muy parecido al anterior pero con niveles de multiplicación en meseta ligeramente superior a los de la forma ATCC sin diferencia significativa de crecimiento en las distintas aguas durante la 1ª y la 2ª hora incluida el agua de la red aunque estas diferencias si se mostraron en la 3ª horas con respecto al agua de control y asimismo a las 24 horas con este agua y el agua OLIG., CRB. y RAD. en las que presentó una clara inhibición a las 24 horas.

La condición de Gram (+) de este germen que incluye la presencia en su pared de ácidos teicóicos y lipoteicóicos que junto a los polimeros de la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico fundamentalmente le dan estructura y sin duda resistencia. No obstante, acaba mostrándose vulnerable en las aguas

mineromedicinales, posiblemente por los cambios del pH, capaces de seleccionar la sobrevivencia de diferentes microorganismos, así como por la presencia de los compuestos inorgánicos de las aguas frente a los que aún siendo una bacteria halófila al no comportarse como oligotrofa no parecen favorecerla, y/ó por la diferente presión de oxígeno a la que también es sensible, aun cuando podría ser anaerobio facultativo. Estas condiciones presentes en las aguas no son las habituales de los medios en los que este germen se desenvuelve habitualmente, que tienen incluso menor actividad de agua como son las heridas, mucosas y la piel^{185 a 187}.

La forma del germen Aislado Clínico es la que se puede aportar por los bañista al agua de las piscinas, y es, de las dos formas del germen, la que se ha comportado de manera más vulnerable finalmente en la experimentación. Recientes estudios ponen de manifiesto que el *S.aureus* Coag. (+) no suele estar presente en las aguas de distintos balnearios investigados¹⁸⁸.

Por lo que respecta a los cambios enzimáticos de este germen en el conjunto de las aguas se observa que es el germen con menor porcentaje de cambios con respecto a los demás gérmenes del estudio, siendo a su vez la forma ATCC la que ha mostrado esos escasos cambios que sugieren que el germen logra mantener su resistencia, ya que está dotado de fosfatasas, tanto alcalinas como ácidas, que le confieren adaptabilidad así como glucosidasas que le aseguran su metabolismo y lipasas que le facilitan su sobrevivencia en la piel^{189,190}.

Consideramos que el control de dicho germen en las piscinas debe hacerse con una adecuada renovación del agua y/o su dilución, ó asimismo con el empleo de filtros de arena, no obstante consideramos que la presencia de este germen en las aguas no representa una gran amenaza para los bañista salvo que sufran una situación orgánica muy comprometida lo que no suele ser compatible con el tratamiento termal^{191,192}.

E. coli ATCC 25922 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de este germen se ha multiplicado activamente, en general, durante la 1ª hora en el conjunto de las aguas mineromedicinales manteniéndose, en el nivel del inóculo en el agua clorada de la red tanto en la 1ª como en la 2ª hora, aunque en esta última ya ha mostrado diferencias significativas en el crecimiento alcanzado en el medio nutritivo y el presentado en el conjunto de las aguas mineromedicinales aunque estas diferencias tanto en la primera como en la segunda hora no han sido significativas entre las distintas aguas ni con las aguas de control, prolongándose esta situación hasta las 24 horas en las cuales el germen ya se inhibió incluso por debajo del inóculo en el agua RAD y en las ciatadas aguas de control.

La forma de Aislado Clínico ha presentado un comportamiento muy semejante al anterior respecto a su multiplicación inicial salvo en el agua CRB., RAD y aguas de control en las que su tendencia a la inhibición sobre todo en el agua RAD no ha diferido significativamente de la presentada en el agua clorada de la red.

Este germen es el primero de los Gram (-) utilizados en este estudio, de él cabe decir que cuenta con gran capacidad de adaptación que muestra en todos los ambientes a pesar de que la capa de peptidoglicanos que presenta en su pared es laxa, cuenta, no obstante, con una capa de lipoproteínas y lipopolisacáridos que le confieren estabilidad. La condición de enterobacteria que sin duda le proporciona esa gran adaptabilidad a los distintos ambientes podrían explicar su multiplicación en meseta en el conjunto de las aguas mineromedicinales y aunque pueda comportarse como oligoautotrofo su sobrevivencia es limitada si no dispone de materia orgánica, tal y como se ha comprobado en distintos trabajos, lo cual está a favor de su tambien limitada presencia en las aguas mineromedicinales tal y como en nuestro caso ha ocurrido sobre todo en el agua CRB. donde distintos estudios

demuestran escasa o nula presencia microbiana en general y así mismo en el agua RAD¹⁸⁸.

Diferentes investigaciones han demostrado que la presencia del *E. coli* en aguas a temperatura ambiente puede ser prolongada pero que las aguas mineromedicinales aunque sean hipotermas no constituyen un ambiente propicio para su desarrollo y proliferación, disminuyendo, además, notablemente su multiplicación a medida que aumenta la temperatura del agua, lo cual evita el riesgo de su presencia en las aguas de baño. Este patógeno tampoco ha estado presente, en general, en las aguas termales de numerosos centros estudiados^{193 a 195}.

En cuanto a los cambios enzimáticos, ocasionados por las aguas mineromedicinales en este germen, han sido muy altos y próximos a los determinados en él por las aguas de control. La abundancia de cambios en las fosfatasas, ácida y alcalina, galactosidasas, fosfohidrolasas y esterases demuestran actividad metabólica, pero en este caso puede ser por autoconsumo ya que el medio mineromedicinal al que se ha expuesto carece de materia orgánica^{196 a 198}.

La presencia de este germen en las piscinas, aunque de ninguna manera es deseable que ocurra, supondría una relativa amenaza ya que el conjunto de cambios enzimáticos que en él ocasiona el contacto con las aguas mineromedicinales sugiere un claro estrés¹⁹⁹ en la bacteria, que es, en este caso precisamente, muy próximo al que le ocasionan las aguas de control, en particular el agua clorada en niveles de potabilización.

Vistos estos resultados, a pesar de la resistencia del germen, clorar las piscinas no higienizaría más que el efecto que ya tienen, según nuestro estudio, las aguas mineromedicinales sobre dicho germen, que por otra parte es un germen ubicuo, es decir, altamente adaptativo a cualquier ambiente, incluido los medios en los que se

practica la cloración habida cuenta, además, que no surgen tampoco en los balnearios brotes de la patología causada por este agente.

P. aeruginosa ATCC 27853 y de Aislado Clínico

La forma ATCC de este germen ha mostrado en el conjunto de las aguas solamente una ligera sobrevivencia con clara tendencia a la inhibición a partir de la 2ª hora, salvo en el agua B.S. donde dicha inhibición fue mayor, incluso, que en las aguas de control ya desde el inóculo, pero en este agua a partir de la 2ª hora de exposición el germen se multiplicó, dando un perfil de recuperación en dos tiempos, semejante a lo que ocurre con su crecimiento en el medio nutritivo, continuando en todo momento, no obstante, por debajo del nivel del inóculo.

Aunque no hubo diferencias significativas en el conjunto de las aguas entre sí, sí las hubo entre éstas respecto a las aguas de control y en las dos primeras horas, también, respecto al agua B.S., sin embargo, cabe decir que esta forma del germen presenta baja sobrevivencia en las aguas mineromedicinales en general.

La forma del germen de Aislado Clínico, ha mostrado mas capacidad de multiplicación que el germen ATCC, pero su crecimiento en el medio nutritivo ha sido significativamente superior que el conseguido en las aguas de control. Destaca entre ellas la sobrevivencia en la CRB. durante la 1ª hora, al cabo de la cual en ella ya presenta inhibición. En el agua RAD. tras inhibición durante la 1ª hora sin diferencia con el agua de la red, se presenta una ligerísima multiplicación seguida de sobrevivencia en meseta aunque por debajo del inóculo hasta el final de la exposición, la cual fue más acentuada aún en el agua B.S.

Este germen Gram (-) con frecuencia está presente en las aguas dada su gran capacidad de adaptación y presenta un perfil de crecimiento en dos tiempos donde

se aprecia capacidad de recuperación frente a la inicial tendencia a la inhibición. Tiene también una gran tolerancia a las oscilaciones físicas del ambiente donde es capaz de mostrar distintos mutantes con diferente virulencia, libera exotoxinas y se constituye patógeno oportunista para personas con bajo nivel de defensas. Este germen, en sus distintas especies, pertenece a la categoría de los oligocarbotolerantes moderadamente halófilas y puede desarrollarse en las aguas y permanecer viables durante mucho tiempo pudiendo potenciarse si en ese agua estuvieran presentes otros gérmenes tales como *Aeromona hydrophila*, asimismo se la ha encontrado en piscinas de hidroterapia y recreo, así como en medios donde puedan crecer biofilms^{200 a 202}.

El porcentaje de cambios enzimáticos no ha sido homogéneo en las distintas aguas apareciendo para la forma ATCC el menor porcentaje de cambios en el agua OLIG. y, en la forma de Aislado Clínico, en el agua S.S.H., siendo en conjunto el porcentaje de cambios, moderado y ligeramente inferior en las aguas mineromedicinales para la forma de Aislado Clínico que en el agua de la red. Por otra parte los considerables cambios enzimáticos sobre la esterasa, esterasa-lipasa y leucina arilamidasa, de acuerdo con su inhibición, parecen sugerir autoconsumo del germen en el que también se reduce la fosfatasa ácida, siendo todo ello próximo a lo que en él produce el agua de la red, todo lo cual nos hace pensar que aunque estuviera presente el germen en las piscinas, el estrés, puesto de manifiesto por dichos cambios, habrá modificado sus características esenciales^{203,204}.

Además, al haber sido, incluso, mas apreciable los citados cambios enzimáticos en el germen Aislado Clínico, podemos pensar que efectivamente las aguas son capaces de alterar el equilibrio interno del germen lo cual justificaría que aunque este microorganismos se ha encontrado en manantiales de aguas mineromedicinales como consecuencia de la falta de protección del acuífero, tampoco parece protagonizar brotes de personas infectadas por su causa en los balnearios. No obstante, dada su tendencia a la multiplicación durante la 1ª hora de exposición, es

deseable la utilización de filtros de arena, la renovación constante del agua de balneación y la vigilancia de los perímetros de protección de los manantiales¹⁹².

Visto todo lo anterior, y a modo de síntesis, en las aguas mineromedicinales utilizadas para el estudio, los gérmenes que han presentado menor vegetatividad son *S. aureus* en su forma de Aislado Clínico, *P. aeruginosa* ATCC, *S. aureus* ATCC, *P. aeruginosa* Aislado Clínico, *E. coli* Aislado Clínico y *E. coli* ATCC habiendo presentado este último germen, que es el que se ha mostrado mas activo en todas las aguas aquí estudiadas, el mayor porcentaje de cambios enzimáticos, lo cual sugiere que aunque haya sido el germen más resistente en las aguas, parece asociarse a un mayor estrés ó al menos a una mayor actividad adaptativa.

L. pneumophila SG 1, cepa Philadelphia

Se reconoce desde los primeros brotes de legionelosis hasta el momento presente, gracias a los multiples estudios que se han efectuado, que las bacterias de la Familia Legionellaceae son ubicuas y pueden encontrarse por tanto en el ambiente natural y asimismo en el ambiente comunitario. Favorecen su crecimiento la presencia de biofilms e igualmente que el ambiente oscile en un amplio rango de temperaturas, de pH y de oxígeno disuelto en el agua.

La *L. pneumophila* en nuestro estudio se ha comportado como un germen con alto nivel de vitalidad en su medio nutritivo donde solo inicia un ligero descenso al cabo de muchas horas de crecimiento. En las aguas mineromedicinales, en general, se ha desarrollado de manera semejante multiplicándose en todas ellas durante las primeras horas de exposición. Mas tarde ya inicia, también en casi todas, una reducción manteniéndose un tiempo en meseta y mostrando después en ellas un progresivo descenso, sobre todo en el agua destilada. Las aguas en las que muestra mas comodidad para su multiplicación son las más ricas en elementos de

mineralización tales como la S.S.H. y la B.S. El agua CRB. la OLIG. y la RAD. parecen menos idóneas para su crecimiento aunque las diferencia entre sí no son significativas. No obstante lo anterior, en todas las aguas ha conservado la hidrólisis del hipurato y la positividad de la oxidasa, lo que indica que conserva su capacidad metabólica, sin embargo en todos los casos mostró pérdida de su inmunofluorescencia inicial.

En cuanto a las aguas de control, también para este germen han sido la destilada, por su efecto lítico tras el contacto prolongado, y el agua clorada de la red; ésta última con un nivel de cloro libre residual de 0,4 p.p.m., inhibió desde el primer momento al germen, mientras que la destilada permitió su sobrevivencia tras la multiplicación inicial en ella, para quedar luego casi al nivel del inóculo, ya que éste al finalizar la observación alcanzó 0,09 unidades logarítmicas de incremento el cual fue el menor de todas las aguas. Desde el punto de vista cualitativo también en este agua destilada la *L. pneumophila* conservó la hidrólisis del hipurato y la positividad de la oxidasa, pero perdió la capacidad de inmunofluorescencia.

La pérdida de la inmunofluorescencia en todas las aguas de la experimentación, demuestra que el germen ha tenido cierto grado de vulneración por todas las aguas mineromedicinales valoradas en este estudio y asimismo en el agua destilada, a pesar de ser un germen oligotrofo. La inhibición en el agua clorada desde los primeros momentos de su inoculación en ella demuestra que el cloro ha vulnerado rotundamente a esta cepa, pero esta situación no significa que tenga lugar esa misma inhibición con las legionelas que no sean cepas conservadas en laboratorio, tal y como han demostrado distintos autores sobre la resistencia que ha desarrollado este germen al cloro.

Por otra parte en un centro mineromedicinal, mas que a la cloración, que puede no ser efectiva por lo antes dicho, debemos proceder a la limpieza frecuente y exhaustiva capaz de remover -biofilms- en los que abundan las amebas, que es

donde se acantona^{205,206}, procediendo a cepillados frecuentes de los puntos críticos de las instalaciones hidroterápicas, pudiéndose practicar, en todo caso limpieza de barrido con cloro periódicamente ó calentamiento puntual de las aguas para esa misma limpieza. El estudio de la antigenuria en el personal empleado, además de constituir una medida con valor preventivo, cabe valorarse como una lectura indirecta de la posible presencia del germen en el ambiente termal donde asimismo es posible detectarlo *in situ* directamente por medio de análisis de enzimoimmunoensayo.

Toda esta realidad experimental podría justificar la ausencia en los centros termales^{207,208}, a diferencia de lo que ocurre en otros ambientes de recreo acuático, de procesos clínicos de naturaleza infectocontagiosa ó incluso de brotes epidémicos en los bañistas, relacionados ó adquiridos a partir del contacto con el agua, a pesar de que en estos últimos años se hayan declarado algún caso aislado de legionelosis, siendo a la vez, negativa la presencia del germen en las aguas del centro lo que se explicaría en base a que los servicios termales para aparato respiratorio podrían haber facilitado la autoaspiración de secreciones infectadas por dicho germen a partir de la colonización en una forma saprofita del mismo en las vías respiratorias altas, tal y como se ha descrito para neumonías por estreptococos por distintos autores^{209,210}.

Asimismo, cabe justificar que el hallazgo por estudios ecológicos de *L. pneumophila* en los entornos termales con ausencia, tanto de casos aislados como de brotes de enfermedad, no solo se deba a que las personas expuestas tengan baja susceptibilidad al germen allí presente, aún en concentración infectante, sino a que el contacto con el agua termal haya podido desnaturalizarlo y modificar su capacidad patógena.

II.- Sobre los resultados del estudio de laboratorio de las aguas e instalaciones crenoterápicas y del estudio de campo en el Balneario de Alange.

A) Recuento bacteriano en el laboratorio mediante plaqueo directo y asimismo búsqueda de *L. pneumophila* en las aguas del establecimiento termal.

Estudiadas en el laboratorio las aguas del manantial y de las instalaciones hidroterápicas del Balneario de Alange con la sistemática de plaquear una gota tomada al azar, en el seno del agua muestreada, tal y como se describió en material y método, puede observarse en los resultados, que ha crecido un escasísimo número de gérmenes, tanto del agua procedente de las piscinas frías como de la procedente de la piscina templada, habiendo sido en todos los casos *Providentia stuartii* un coliforme no patógeno.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis efectuados en distintos momentos por la empresa y también con los que regularmente realiza la Consejería de Sanidad de la Junta de Extremadura para la Sanidad Local y, asimismo, con los efectuados por la Comisión de Aguas del Instituto de España -Real Academia de Farmacia- publicados en su Monografía sobre Alange²¹¹.

En efecto, estos resultados estaban dentro de lo esperable, habida cuenta de que en los muchos años de ejercicio profesional en este Centro Balneario, no ha tenido lugar ningún brote de patología de transmisión hídrica entre los curistas, ni entre los vecinos del municipio, ó los del entorno, que consumen el agua del manantial para su ingesta, sin someterla a ningún tratamiento higiénico de potabilización.

Un estudio sobre la microbiología de los manantiales de distintos centros termales efectuado recientemente y defendido como Tesis Doctoral demostró

asimismo, siendo, además, una de sus conclusiones, que El Manantial del Balneario de Alange fue el que presentó de entre los de categoría hipotermal -un número menor de bacterias- no siendo ninguna de ellas patógenas¹⁸⁸.

La condición no solo hipotermal sinó oligomineral que además de radiactiva¹⁹² tiene el agua, sin duda, se suman para facilitar el hecho de no ser un medio idóneo para el crecimiento de los gérmenes, aunque estos sean oligotrofos ó quimiotrofos.

Por otra parte, la atención al protocolo de exhaustiva y sistemática higiene con la que ya cuenta el Balneario para las instalaciones, así como la adecuada administración del agua termal, consideramos que no hace en absoluto necesario añadir un tratamiento químico a dicha agua, a la que, en última instancia, le bastaría con el uso de filtros de arena si se quisiera eliminar esa escasísima presencia de gérmenes no patógenos que podríamos considerar flora de crecimiento habitual seleccionada por las características de la surgencia del agua desde el fondo de las lagunas naturales en las que se practica la balneación.

B) Filtración por membrana y test detección de *L. pneumophila* realizado *in situ* a las aguas, instalaciones y personal perteneciente al centro termal.

Realizada asimismo la filtración por membrana de muestras de agua de dichas localizaciones, manatiales, piscinas, tuberías, etc., no ya en el laboratorio, sinó por el método de campo, en las instalaciones del balneario, resultó que, asimismo, se aislaron gérmenes Gram (-), sobre todo coliformes no patógenos en un número, equivalente al simultáneamente hallado en nuestro trabajo de laboratorio, lo cual valida este método de campo; dicho número, por otra parte, es inferior incluso al permitido por la legislación en el estudio de aguas, si

contamos además con la sobrevivencia que en aguas envasadas y en medios naturales tienen los gérmenes^{214,215}.

Además, el protocolo de hidroterapia incluye, para todos los curistas que han de recibir baño en piscina común, la aplicación de ducha y chorro previos a dicho baño, que sistemáticamente reciben, con los que además del efecto tonificante que a nivel hidroterapéutico proporcionan, se consigue un efecto de higiene general por el que se controla, en todos los casos, la posible aportación de gérmenes que pudieran hacer dichos curistas, lo cual se añade al control que se consigue por su propia higiene personal durante la estancia en el centro termal.

Por lo que se refiere al estudio de la *L. pneumophila* SG 1, el resultado ha sido ausencia de dicho germen, una vez sembrada las muestras en su correspondiente medio en el laboratorio, así como ausencia en ella de algas y amebas tras el examen al microscopio según la técnica oportuna, en todas las muestras, procedentes tanto del manantial como de las distintas instalaciones hidroterápicas del balneario. Esta negatividad ha coincidido igualmente con el resultado de los test de enzimoimmunoensayo realizados en el Balneario como método de campo, según lo referido en Material y Método, a partir de las mismas muestras que posteriormente se sembraron en el medio idóneo en el laboratorio, con ello, asimismo se ha podido validar dicho recurso para el control de esta posible contaminación en las instalaciones y en el entorno del Balneario, dada la coincidencia de resultados al cien por cien, con los resultados de laboratorio.

La ausencia de algas y amebas en el agua del manantial y de las instalaciones hidroterápicas, es coherente con la negatividad tras su siembra, dada la dependencia que la *L. pneumophila* tiene de ellos para multiplicarse y alcanzar niveles infectantes^{216,217}. En su ausencia, el germen puede estar presente, ya que tiene una distribución universal y es además oligotrofo aunque temperatura-

-dependiente, pero no suele alcanzar un número capaz de producir brotes. Su transmisión a través de los microaerosoles que se producen en torno a las duchas y/o aplicaciones directas de aerosoles de agua mineromedicinal, obliga a la vigilancia de su posible presencia en estos medios termales los cuales se consideran de riesgo para la legionelosis, una mas de entre las llamadas Neumonías Adquiridas en la Comunidad.

Las condiciones del Balneario de Alange en cuanto a la naturaleza de sus aguas, su temperatura hipotermal, y la ausencia de biofilms en su manantial e instalaciones, las cuales se someten a un exhaustivo protocolo de higiene, dejan muy limitadas las posibilidades de brotes debidos a este germen, no obstante, es preciso para la prevención adecuada de esta posible infección en los medios termales en general, ya que a ellos acuden personas que suelen presentar, en muchos casos, condiciones de riesgo para la infección, vigilar y controlar en lo posible, además, el entorno balneario ya que en él pueden darse condiciones para su multiplicación, pudiendo utilizarse para ello, tanto pruebas *in situ*, como las aquí practicadas para poder actuar con rapidez si fueran positivas, además de las siembras en el medio idóneo en el laboratorio, donde el resultado será mas tardío dadas las características de crecimiento del germen.

Por otra parte, la pérdida de la inmunofluorescencia que, tras su exposición a las distintas aguas, incluida la de Alange, ha presentado la *L. pneumophila*, tal y como ya hemos dicho, informa de que aunque estuviera presente el germen, posiblemente su capacidad infectante estaría vulnerada, tal y como ocurre en otros microorganismos expuestos a ambientes donde habitualmente no se desarrollan, lo cual coincide con la ausencia de brotes en este medio termal^{218,219}.

En cuanto a los resultados del test de enzimoimmunoensayo para detectar antigenuria de *L. pneumophila*, el resultado negativo en el cien por cien de la

totalidad del personal técnico del centro estudiado, cabe interpretarlo, como que dichas personas no han estado expuestas, al menos, durante el último año de la *L. pneumophila* y habida cuenta de que trabajan en el balneario es posible deducir que ni en este medio ni en otros, que dichas personas hayan frecuentado, han tomado contacto en el nivel de colonización, ni en el de enfermedad, dado el resultado negativo del test. Aunque no se demuestra siempre, mas de un autor admite la condición de colonización, sobre todo a nivel faríngeo, por este germen y la posibilidad de detección de sus antígenos en la orina, tal y como ocurre a propósito de la colonización nasofaríngea por neumococos sin enfermedad, en las cuales es un hecho, si ha habido ya infección. Practicar este test al personal del Balneario, además de permitir un diagnóstico precoz de colonización, consideramos que puede ser orientativo sobre la presencia del microorganismo en el medio^{220 a 222}.

Como síntesis de esta discusión sobre el efecto que en los gérmenes estudiados han tenido las aguas aquí utilizadas, cabe llegar a las conclusiones que a continuación exponemos, aún cuando una vez que hemos sistematizado el método de investigación, consideramos que es preciso continuar en esta labor de objetivación, del efecto de las aguas sobre los microorganismos, como base orientadora para la Administración, en orden a la Protección de la Integridad de las Aguas Mineromedicinales y de la Salud Pública.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Las aguas mineromedicinales estudiadas, en general, no constituyen medios nutritivos, al menos durante las primeras 24 horas de exposición, para los gérmenes aquí valorados, -72 horas en el caso de *Legionella pneumophila*-, dada la diferencia significativa de la menor multiplicación de dichos gérmenes en ellas, frente al crecimiento que alcanzan en el medio nutritivo de laboratorio, salvo en el agua B.S. donde el *Escherichia coli* ATCC no mostró esa diferencia durante la 1ª hora de exposición, y asimismo en las aguas S.S.H., OLIG. y B.S. donde, a su vez, también en la 1ª hora de exposición, el *Escherichia coli* de Aislado Clínico creció sin diferencia con el medio nutritivo, todo ello, quizá, debido a la condición ubicua de este germen.
- 2.- El *Staphilococcus aureus* Coagulasa (+) ATCC se ha multiplicado de forma moderada en las aguas B.S. y S.S.H., y de forma progresivamente más ligera en las aguas OLIG., CRB. y RAD. tendiendo en todas ellas a la inhibición final, su multiplicación en las aguas mineromedicinales, en general, no ha diferido significativamente de la alcanzada en el agua clorada y destilada, a lo largo de la correspondiente exposición.
- 3.- El *Staphilococcus aureus* Coagulasa (+) de Aislado Clínico ha presentado una multiplicación global en las aguas mineromedicinales, inferior a la del germen de la forma ATCC, tendiendo también a la inhibición final a partir de la 1ª hora de exposición, la multiplicación en dichas aguas no ha mostrado hasta la 3ª hora diferencia significativa respecto a la alcanzada en el agua clorada de la red, habiendo mostrado más vulnerabilidad que la forma del germen ATCC.

- 4.- El *Escherichia coli* ATCC se ha inhibido ligeramente, ya desde la 1ª hora, en el agua S.S.H., ha presentado un perfil de sobrevivencia en el agua OLIG., se ha multiplicado de forma escasa en las aguas CRB. y RAD., y de forma notable en el agua B.S., reduciéndose, finalmente, en todas las aguas al nivel del inóculo inicial e incluso a un nivel inferior. La vegetatividad del germen en estas aguas no ha diferido significativamente, sobre todo en la 1ª hora, de la alcanzada en el agua clorada de control salvo en el caso del agua B.S.
- 5.- El *Escherichia coli* de Aislado Clínico ha proliferado más que el germen ATCC en estas aguas mineromedicinales, posiblemente por sus condiciones de ubicuidad, salvo en el agua CRB. y en el agua RAD., inhibiéndose en ésta última muy por debajo del inóculo inicial, habiendo mostrado diferencia significativa, de mayor multiplicación, en las aguas S.S.H., B.S., y OLIG. respecto a su crecimiento en el agua clorada, no existiendo esa diferencia, en las primeras horas de exposición, con las aguas RAD. y CRB.
- 6.- La *Pseudomona aeruginosa* ATCC ha presentado un patrón de muy ligera sobrevivencia y clara tendencia a la inhibición, en todas las aguas mineromedicinales valoradas, mostrando, no obstante, diferencia significativa de vegetatividad entre su sobrevivencia en estas aguas y la alcanzada en el agua clorada de la red, salvo en el caso del agua B.S. en las dos primeras horas de exposición.
- 7.- La *Pseudomona aeruginosa* de Aislado Clínico ha mostrado una moderada sobrevivencia, seguida de inhibición por debajo del inóculo, salvo en las aguas CRB. y OLIG. donde presenta mayor multiplicación en las horas iniciales. La vegetatividad del germen en estas aguas aquí estudiadas, durante las dos primeras horas, excepto en el agua RAD., presenta diferencia significativa con la alcanzada en el agua clorada de la red.

- 8.- La *Legionella pneumophila* SG 1 cepa Philadelphia, ha mostrado un patrón de multiplicación moderada durante las primeras 48 horas en todas las aguas utilizadas en esta investigación, seguido de una progresiva reducción, sobre todo en las aguas OLIG. y RAD., no habiéndose presentado diferencia significativa entre su multiplicación en las aguas mineromedicinales y la alcanzada en el agua destilada que, es en este caso la de control, al haberse inhibido enseguida el inóculo de esta cepa en el agua clorada de la red, habiendo perdido su inmunofluorescencia inicial en todas las aguas.
- 9.- El conjunto de gérmenes inoculados en las aguas mineromedicinales aquí estudiadas, ha presentado una vegetatividad progresivamente menor en las aguas B.S., S.S.H., CRB., OLIG. y RAD.
- 10.- Confirmado en todos los gérmenes de esta investigación, que su perfil enzimático correspondía al esperado para su identidad microbiológica, se comprobó que el mayor porcentaje de cambios enzimáticos, sugerente de estrés bacteriano, producido por las distintas aguas mineromedicinales, se ha detectado en *E. coli*, seguido de *P. aeruginosa* y del *S. aureus*, todos en su forma de Aislado Clínico, y con ese mismo orden, pero con un nivel inferior de cambios, en la forma ATCC de dichos gérmenes, alcanzando la mayor proporción de cambios, en particular la *P. aeruginosa* Aislado Clínico, en el agua B.S., y el menor nivel, el *S. aureus* ATCC en el agua OLIG.
- 11.- En el porcentaje de cambios enzimáticos, sugerente de estrés bacteriano, que han producido las aguas mineromedicinales y de control en los distintos gérmenes estudiados, destacan, según orden, las aguas B.S. seguidas de CRB., RAD. y S.S.H. con un porcentaje próximo entre sí, y prácticamente equivalente al determinado por el agua clorada de la red, habiendo sido algo inferior al de ésta los cambios ocasionados por el agua OLIG.

- 12.- Durante el estudio de laboratorio del agua naciente y de la ya utilizada en piscinas del Balneario de Alange, se puso de manifiesto, en todos los casos, y coincidiendo con lo publicado por otros autores, el recuento de un escasísimo número de colonias aisladas del coliforme no patógeno *Providenzia stuartii*, no habiéndose encontrado algas y/o amebas, ni asimismo *Legionella pneumophila* SG 1, siendo apreciable la coincidencia de este resultado con lo obtenido *in situ* por medio del método de filtración por membrana.
- 13.- La ausencia de infecciones en los bañistas y/o brotes epidémicos durante los días de tratamiento en el Balneario de Alange, constatada a lo largo de muchos años de observación, cabe explicarla, según lo demostrado en este estudio, por la escasa/nula presencia de gérmenes en su agua naciente, por el efecto inhibidor que sobre los potenciales contaminantes microbianos realiza su agua OLIGOMINERAL-RADIATIVA, y, asimismo, por los cambios enzimáticos que sobre aquellos determina dicha agua mineromedicinal.
- 14.- La vegetatividad de los microorganismos, en las Aguas Mineromedicinales del Balneario de Alange y las demás aquí estudiadas, ha sido, en general, equivalente a la alcanzada en el agua clorada de la red durante la primera hora de exposición, y sus efectos enzimáticos en los distintos gérmenes superiores a los de aquella, por lo que, respetado el protocolo de higiene general y específico de cada medio termal, en relación con la Salud Pública, ESTAS AGUAS PUEDEN UTILIZARSE TAL Y COMO EMERGEN Y SEGUIR EXENTAS DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS, conservando así su equilibrio original y los correspondientes efectos terapéuticos.

**RELACIÓN DE TABLAS DE RESULTADOS DE LA
EXPERIMENTACIÓN Y ESTUDIO DE CAMPO
E ICONOGRAFÍA**

BLOQUE DE TABLAS -I-
(nº total de tablas 8)

**NÚMERO DE EXPERIMENTO Y EXPRESIÓN LOGARÍTMICA DEL
RECuento DE GÉRMESES SEGÚN HORAS DE EXPOSICIÓN A LAS
AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**

NÚMERO DE EXPERIMENTO Y EXPRESIÓN LOGARÍTMICA DEL RECUENTO DE GÉRMEENES **TRAS LA 1ª HORA DE EXPOSICIÓN A LAS AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) ATCC | 1º | 7,07 | 6,75 | 6,47 | 6,99 | 6,75 | 6,43 | 6,39 | 6,86 | 6,73 | 6,45 | 6,05 | 6,25 |
| | 2º | 6,99 | 6,05 | 5,75 | 6,82 | 6,51 | 6,27 | 6,25 | 6,71 | 6,51 | 6,26 | 6,16 | 5,47 |
| | 3º | 7,45 | 6,28 | 6,25 | 6,54 | 6,29 | 6,15 | 6,18 | 6,49 | 6,19 | 6,36 | 5,75 | 6,05 |
| | 4º | 7,52 | 6,25 | 6,06 | 6,38 | 6,14 | 6,10 | 6,12 | 6,21 | 6,08 | 6,10 | 5,59 | 5,65 |
| | 5º | 7,47 | 6,42 | 6,27 | 6,77 | 6,31 | 6,00 | 6,16 | 6,53 | 6,34 | 5,88 | 5,95 | 5,93 |
| | *µ | 7,30 | 6,35 | 6,16 | 6,70 | 6,40 | 6,19 | 6,22 | 6,56 | 6,37 | 6,21 | 5,90 | 5,87 |
| <i>Stafilo.aur.</i> Coag (+) Ais.Clín | 1º | 7,90 | 6,75 | 6,45 | 6,89 | 6,51 | 6,41 | 6,09 | 6,79 | 5,97 | 6,53 | 6,34 | 6,15 |
| | 2º | 7,67 | 6,50 | 6,28 | 6,63 | 6,39 | 6,28 | 5,87 | 6,55 | 6,15 | 6,61 | 6,42 | 5,99 |
| | 3º | 7,31 | 6,28 | 6,15 | 6,37 | 6,17 | 6,15 | 5,76 | 6,38 | 5,68 | 5,98 | 6,18 | 5,77 |
| | 4º | 7,05 | 6,15 | 6,08 | 6,18 | 6,09 | 6,10 | 5,54 | 6,16 | 5,49 | 6,14 | 5,98 | 5,46 |
| | 5º | 7,32 | 6,52 | 5,94 | 6,43 | 5,94 | 6,16 | 6,04 | 6,62 | 5,91 | 6,19 | 5,78 | 5,58 |
| | *µ | 7,45 | 6,44 | 6,18 | 6,50 | 6,22 | 6,22 | 5,86 | 6,50 | 5,84 | 6,29 | 6,14 | 5,79 |
| <i>E.coli</i> ATCC | 1º | 6,69 | 6,10 | 5,78 | 6,75 | 6,43 | 6,42 | 6,00 | 6,27 | 6,19 | 6,45 | 6,17 | 5,87 |
| | 2º | 6,81 | 6,32 | 5,93 | 6,83 | 6,65 | 6,58 | 6,15 | 6,43 | 6,31 | 6,58 | 6,42 | 5,95 |
| | 3º | 6,45 | 5,79 | 5,49 | 6,39 | 6,18 | 6,21 | 5,83 | 6,10 | 5,96 | 6,23 | 5,87 | 5,58 |
| | 4º | 6,38 | 5,65 | 5,34 | 6,23 | 6,12 | 6,14 | 5,68 | 5,98 | 5,79 | 6,14 | 5,69 | 5,46 |
| | 5º | 6,47 | 5,74 | 5,51 | 6,65 | 5,67 | 6,1 | 6,19 | 5,97 | 6,00 | 6,15 | 6,25 | 5,79 |
| | *µ | 6,56 | 5,92 | 5,73 | 6,57 | 6,21 | 6,29 | 5,97 | 6,15 | 6,05 | 6,31 | 6,08 | 5,73 |
| <i>E.coli</i> Ais.Clín. | 1º | 6,87 | 6,82 | 6,73 | 6,75 | 6,73 | 6,30 | 6,37 | 6,78 | 5,86 | 5,81 | 5,59 | 6,17 |
| | 2º | 6,93 | 6,89 | 6,89 | 6,81 | 6,81 | 6,45 | 6,49 | 6,90 | 5,97 | 5,89 | 5,43 | 6,24 |
| | 3º | 6,58 | 6,51 | 6,43 | 6,49 | 6,45 | 6,00 | 6,15 | 6,54 | 5,63 | 5,67 | 5,79 | 5,98 |
| | 4º | 6,45 | 6,39 | 6,29 | 6,37 | 6,29 | 5,97 | 6,00 | 6,39 | 5,48 | 5,59 | 5,86 | 5,79 |
| | 5º | 6,82 | 6,69 | 5,05 | 6,63 | 6,62 | 6,08 | 5,09 | 6,49 | 5,81 | 5,99 | 5,93 | 6,02 |
| | *µ | 6,73 | 6,66 | 6,58 | 6,61 | 6,58 | 6,16 | 6,22 | 6,62 | 5,75 | 5,79 | 5,72 | 6,04 |

Bloque -I-

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | 1° | 6,96 | 6,28 | 5,80 | 5,58 | 5,27 | 6,17 | 6,08 | 6,19 | 5,67 | 6,31 | 5,79 | 5,79 |
| | 2° | 7,04 | 6,35 | 5,87 | 5,70 | 5,39 | 6,29 | 6,21 | 6,31 | 5,79 | 6,45 | 5,58 | 5,86 |
| | 3° | 6,75 | 6,09 | 5,53 | 5,32 | 5,08 | 5,98 | 5,89 | 5,96 | 5,40 | 6,07 | 6,12 | 5,59 |
| | 4° | 6,63 | 5,97 | 5,39 | 5,19 | 4,98 | 5,85 | 5,68 | 5,83 | 5,29 | 5,89 | 6,27 | 5,52 |
| | 5° | 6,82 | 5,96 | 5,81 | 5,45 | 4,93 | 5,81 | 5,99 | 6,06 | 5,50 | 6,23 | 6,04 | 5,89 |
| | *μ | 6,84 | 6,13 | 5,68 | 5,45 | 5,13 | 6,02 | 5,97 | 6,07 | 5,53 | 6,19 | 5,96 | 5,73 |
| <i>Pseud. aer.</i> Ais.Clin. | 1° | 7,05 | 6,26 | 5,78 | 6,37 | 5,78 | 6,75 | 5,75 | 5,57 | 6,48 | 5,87 | 5,54 | 5,99 |
| | 2° | 7,19 | 6,38 | 5,89 | 6,49 | 5,85 | 6,89 | 5,90 | 6,69 | 6,59 | 5,99 | 5,38 | 6,11 |
| | 3° | 6,85 | 6,07 | 5,53 | 6,13 | 5,54 | 6,48 | 5,48 | 6,34 | 6,26 | 5,61 | 5,82 | 5,80 |
| | 4° | 6,73 | 5,95 | 5,39 | 6,05 | 5,41 | 6,37 | 5,32 | 6,22 | 6,15 | 5,49 | 5,90 | 5,68 |
| | 5° | 7,03 | 5,99 | 5,76 | 6,01 | 5,77 | 6,56 | 5,60 | 6,23 | 6,32 | 5,79 | 5,71 | 6,07 |
| | *μ | 6,97 | 6,13 | 5,67 | 6,21 | 5,67 | 6,61 | 5,61 | 6,41 | 6,36 | 5,75 | 5,67 | 5,93 |
| <i>Legionella pneumophilla</i> SG1 | 1° | 7,67 | 7,07 | | 6,79 | | 6,78 | | 6,81 | | 6,79 | | 6,69 |
| | 2° | 7,79 | 7,19 | | 6,88 | | 6,91 | | 6,87 | | 6,91 | | 6,81 |
| | 3° | 7,43 | 6,85 | | 6,62 | | 6,53 | | 6,58 | | 6,55 | | 6,52 |
| | 4° | 7,31 | 6,72 | | 6,49 | | 6,42 | | 6,45 | | 6,42 | | 6,39 |
| | 5° | 7,55 | 7,12 | | 6,97 | | 6,81 | | 6,74 | | 6,68 | | 6,64 |
| | **μ | 7,55 | 6,99 | | 6,75 | | 6,69 | | 6,69 | | 6,67 | | 6,61 |

* μ = valor utilizado para la expresión gráfica en las curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana

**μ = la exposición a las aguas de la *L. pneumophila* ha sido de 48, 72, 96 y 120 horas.

NÚMERO DE EXPERIMENTO Y EXPRESIÓN LOGARÍTMICA DEL RECuento DE GÉRMEs
TRAS LA 2ª HORA DE EXPOSICIÓN A LAS AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) ATCC | 1º | 8,29 | 6.83 | 6,18 | 6,75 | 6,23 | 6,55 | 6,39 | 6,61 | 6,54 | 6,07 | 5,61 | 6,00 |
| | 2º | 7,30 | 6.51 | 6,00 | 6,58 | 6,15 | 6,38 | 6,21 | 6,48 | 6,41 | 6,21 | 5,49 | 5,90 |
| | 3º | 8 | 6.12 | 5,95 | 6,47 | 5,99 | 6,19 | 6,15 | 6,20 | 6,19 | 5,89 | 5,79 | 5,34 |
| | 4º | 8,17 | 6,05 | 5,70 | 6,25 | 5,76 | 6,10 | 6,09 | 6,17 | 6,07 | 5,76 | 5,86 | 5,16 |
| | 5º | 7,84 | 6,79 | 6,07 | 6,45 | 6,17 | 6,08 | 6,06 | 6,24 | 6,14 | 5,77 | 5,95 | 5,85 |
| | *µ | 7,92 | 6,46 | 5,98 | 6,50 | 6,06 | 6,26 | 6,18 | 6,34 | 6,27 | 5,94 | 5,74 | 5,65 |
| <i>Stafilo.aur.</i> Coag (+) Ais.Clin | 1º | 8,25 | 6,74 | 6,18 | 6,98 | 6,45 | 6,40 | 5,85 | 6,15 | 5,73 | 6,18 | 6,07 | 5,98 |
| | 2º | 8,13 | 6,59 | 6,07 | 6,71 | 6,25 | 6,28 | 5,69 | 6,28 | 5,91 | 6,05 | 6,21 | 5,76 |
| | 3º | 7,86 | 6,38 | 5,99 | 6,39 | 6,12 | 6,19 | 5,54 | 5,94 | 5,39 | 6,34 | 5,91 | 5,43 |
| | 4º | 7,58 | 6,15 | 5,57 | 6,15 | 6,09 | 6,07 | 5,29 | 5,77 | 5,21 | 6,58 | 5,79 | 5,15 |
| | 5º | 8,03 | 6,24 | 6,04 | 6,47 | 5,99 | 5,96 | 5,98 | 6,01 | 5,36 | 5,90 | 5,82 | 5,93 |
| | *µ | 7,97 | 6,42 | 5,97 | 6,54 | 6,18 | 6,18 | 5,67 | 6,03 | 5,52 | 6,21 | 5,96 | 5,65 |
| <i>E.coli</i> ATCC | 1º | 7,12 | 6,09 | 5,58 | 6,58 | 6,39 | 6,15 | 5,97 | 6,19 | 5,95 | 6,28 | 6,12 | 5,79 |
| | 2º | 7,09 | 6,28 | 5,72 | 6,73 | 6,57 | 6,29 | 6,10 | 6,31 | 6,00 | 6,37 | 6,27 | 5,91 |
| | 3º | 6,78 | 5,84 | 5,34 | 6,29 | 6,21 | 5,97 | 5,68 | 5,97 | 5,73 | 6,10 | 5,79 | 5,48 |
| | 4º | 6,57 | 5,34 | 5,19 | 6,15 | 6,13 | 5,83 | 5,53 | 5,83 | 5,59 | 6,04 | 5,65 | 5,34 |
| | 5º | 7,14 | 5,73 | 5,17 | 6,35 | 6,10 | 5,76 | 5,92 | 6,10 | 6,03 | 6,01 | 5,87 | 5,73 |
| | *µ | 6,94 | 5,90 | 5,40 | 6,42 | 6,28 | 6,00 | 5,84 | 6,08 | 5,86 | 6,16 | 5,94 | 5,65 |
| <i>E.coli</i> Ais.Clin. | 1º | 7,18 | 6,68 | 6,45 | 6,64 | 6,45 | 6,18 | 6,32 | 6,72 | 5,41 | 5,68 | 5,56 | 5,97 |
| | 2º | 7,32 | 6,82 | 6,58 | 6,81 | 6,68 | 6,25 | 6,47 | 6,84 | 5,57 | 5,80 | 5,72 | 6,05 |
| | 3º | 6,95 | 6,39 | 6,19 | 6,45 | 6,27 | 5,97 | 6,11 | 6,43 | 5,23 | 5,47 | 5,29 | 5,68 |
| | 4º | 6,78 | 6,20 | 6,10 | 6,29 | 6,15 | 5,78 | 6,03 | 6,31 | 5,16 | 5,31 | 5,17 | 5,51 |
| | 5º | 7,07 | 6,46 | 6,23 | 6,56 | 6,00 | 6,02 | 5,97 | 6,55 | 5,08 | 5,54 | 5,71 | 6,19 |
| | *µ | 7,06 | 6,51 | 6,31 | 6,55 | 6,31 | 6,04 | 6,18 | 6,57 | 5,29 | 5,56 | 5,49 | 5,88 |

Bloque -I-

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | 1º | 6,99 | 6,17 | 5,49 | 5,59 | 5,15 | 5,97 | 5,95 | 6,15 | 5,23 | 6,17 | 5,57 | 5,73 |
| | 2º | 7,10 | 6,29 | 5,63 | 5,71 | 5,27 | 6,18 | 6,04 | 6,28 | 5,35 | 6,29 | 5,52 | 5,86 |
| | 3º | 6,78 | 5,97 | 5,31 | 5,38 | 4,94 | 5,76 | 5,71 | 5,97 | 5,02 | 5,93 | 5,85 | 5,53 |
| | 4º | 6,67 | 5,83 | 5,27 | 5,21 | 4,81 | 5,62 | 5,58 | 5,85 | 4,97 | 5,76 | 5,91 | 5,39 |
| | 5º | 7,16 | 6,14 | 5,35 | 5,46 | 4,88 | 5,87 | 5,92 | 5,80 | 4,93 | 5,85 | 5,65 | 5,74 |
| | *μ | 6,94 | 6,08 | 5,41 | 5,47 | 5,01 | 5,88 | 5,84 | 6,01 | 5,10 | 6,00 | 5,70 | 5,65 |
| <i>Pseud. aer.</i> Ais.Clin. | 1º | 7,26 | 6,47 | 5,38 | 5,97 | 5,38 | 6,28 | 5,67 | 6,49 | 6,45 | 5,97 | 5,68 | 5,78 |
| | 2º | 7,35 | 6,59 | 5,45 | 6,03 | 5,49 | 6,41 | 5,79 | 6,60 | 6,57 | 6,04 | 5,81 | 5,91 |
| | 3º | 7,07 | 6,25 | 5,17 | 5,72 | 5,17 | 6,03 | 5,38 | 6,25 | 6,21 | 5,71 | 5,47 | 5,53 |
| | 4º | 6,98 | 6,13 | 5,03 | 5,59 | 5,06 | 5,95 | 5,25 | 6,13 | 6,09 | 5,59 | 5,29 | 5,30 |
| | 5º | 7,04 | 6,46 | 5,27 | 5,94 | 5,20 | 5,98 | 5,51 | 6,38 | 6,28 | 5,84 | 5,45 | 5,73 |
| | *μ | 7,14 | 6,38 | 5,26 | 5,85 | 5,26 | 6,13 | 5,52 | 6,37 | 6,32 | 5,83 | 5,54 | 5,65 |
| <i>Legionella</i> <i>pneumophilla</i> SG1 | 1º | 7,85 | 6,98 | | 6,77 | | 6,68 | | 6,65 | | 6,57 | | 6,49 |
| | 2º | 7,98 | 7,10 | | 6,89 | | 6,80 | | 6,78 | | 6,69 | | 6,62 |
| | 3º | 7,73 | 6,75 | | 6,56 | | 6,51 | | 6,41 | | 6,32 | | 6,28 |
| | 4º | 7,61 | 6,62 | | 6,43 | | 6,43 | | 6,29 | | 6,25 | | 6,15 |
| | 5º | 7,83 | 6,90 | | 6,80 | | 6,58 | | 6,57 | | 6,42 | | 6,27 |
| | **μ | 7,80 | 6,87 | | 6,69 | | 6,60 | | 6,54 | | 6,45 | | 6,37 |

* μ = valor utilizado para la expresión gráfica en las curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana

** μ = la incubación de la *L. pneumophila* ha sido de 48, 72, 96 y 120 horas.

NÚMERO DE EXPERIMENTO Y EXPRESIÓN LOGARÍTMICA DEL RECuento DE GÉRMEs TRAS LA 3ª HORA DE EXPOSICIÓN A LAS AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) ATCC | 1º | 7,93 | 6,49 | 5,1 | 6,01 | 5,6 | 6,1 | 6,03 | 6,08 | 6,1 | 5,86 | 5,18 | 5,28 |
| | 2º | 7,96 | 6,56 | 5,46 | 6,29 | 5,96 | 6,39 | 6,44 | 5,89 | 5,88 | 5,99 | 4,83 | 5,47 |
| | 3º | 8 | 6,72 | 5 | 6,14 | 6 | 5,98 | 6,57 | 6,34 | 5,7 | 5,63 | 5,61 | 5,69 |
| | 4º | 8,02 | 6,46 | 5,53 | 6,76 | 6,03 | 6,6 | 6,09 | 6,51 | 6,4 | 5,48 | 5,7 | 5,74 |
| | 5º | 7,94 | 6,98 | 5,41 | 6,8 | 5,71 | 6,58 | 5,97 | 6,43 | 6,62 | 5,94 | 5,13 | 5,52 |
| | *µ | 7,97 | 6,64 | 5,30 | 6,40 | 5,86 | 6,33 | 6,22 | 6,25 | 6,14 | 5,78 | 5,29 | 5,54 |
| <i>Stafilo.aur.</i> Coag (+) Ais.Clín | 1º | 7,99 | 6,13 | 5,36 | 6,82 | 6,14 | 6,15 | 5,21 | 6,12 | 5,25 | 6,29 | 5,97 | 5,18 |
| | 2º | 8,14 | 6,38 | 5,49 | 6,19 | 6,61 | 6,72 | 5,49 | 5,9 | 5,64 | 6,43 | 6,12 | 4,93 |
| | 3º | 8,24 | 5,9 | 4,87 | 6,26 | 5,95 | 5,98 | 5,72 | 5,84 | 5,78 | 6,09 | 5,74 | 5,3 |
| | 4º | 8,31 | 5,97 | 5,01 | 6,5 | 6,3 | 6,3 | 5,64 | 6,22 | 4,8 | 5,98 | 5,58 | 5,21 |
| | 5º | 8,12 | 6,87 | 5,72 | 6,48 | 6,1 | 5,9 | 5,64 | 5,87 | 4,98 | 6,01 | 5,79 | 5,58 |
| | *µ | 8,16 | 6,25 | 5,29 | 6,45 | 6,22 | 6,21 | 5,54 | 5,99 | 5,29 | 6,16 | 5,84 | 5,24 |
| <i>E.coli</i> ATCC | 1º | 6,95 | 5,49 | 5,02 | 6,08 | 6,2 | 6,28 | 5,32 | 6,04 | 5,6 | 5,14 | 5,49 | 5,22 |
| | 2º | 7,03 | 5,56 | 5,24 | 6,54 | 6,32 | 6 | 5,46 | 5,92 | 5,49 | 5,38 | 5,63 | 5,39 |
| | 3º | 7,15 | 5,98 | 5,4 | 5,95 | 5,86 | 5,94 | 5,07 | 6,41 | 6,12 | 5,81 | 5,22 | 5,71 |
| | 4º | 7,64 | 6 | 4,75 | 6,49 | 5,97 | 6,45 | 4,93 | 6,53 | 6,25 | 5,93 | 5,09 | 5,63 |
| | 5º | 7,33 | 6,07 | 5,14 | 6,14 | 6,05 | 6,13 | 5,67 | 6,25 | 5,59 | 5,84 | 5,37 | 5,1 |
| | *µ | 7,22 | 5,82 | 5,11 | 6,24 | 6,08 | 6,16 | 5,29 | 6,23 | 5,81 | 5,62 | 5,36 | 5,41 |
| <i>E.coli</i> Ais.Clín. | 1º | 7,25 | 6,38 | 5,78 | 6,08 | 6,12 | 5,89 | 5,96 | 6,09 | 5,17 | 5,42 | 4,82 | 5,33 |
| | 2º | 7,46 | 6,65 | 6,16 | 6,12 | 5,83 | 5,97 | 5,14 | 6,35 | 5,35 | 5,01 | 4,56 | 5,49 |
| | 3º | 7,58 | 6,2 | 6,38 | 6,93 | 5,61 | 6,17 | 6,8 | 5,79 | 5,5 | 5,7 | 5,23 | 5,72 |
| | 4º | 7,1 | 6,74 | 5,84 | 6,68 | 6,35 | 6,59 | 6,39 | 6,23 | 4,92 | 4,96 | 5,12 | 5,67 |
| | 5º | 7,16 | 6,18 | 5,93 | 6,64 | 6,19 | 5,48 | 5,76 | 6,19 | 5,59 | 5,36 | 5,17 | 5,84 |
| | *µ | 7,31 | 6,43 | 6,02 | 6,49 | 6,02 | 6,02 | 6,21 | 6,13 | 5,30 | 5,29 | 4,98 | 5,61 |

Bloque -I-

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|--|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | 1° | 7,15 | 5,24 | 4,92 | 5,45 | 4,28 | 6,15 | 5,17 | 5,19 | 4,87 | 5,69 | 5,49 | 5,1 |
| | 2° | 7,33 | 5,79 | 5,06 | 5,88 | 4,96 | 5,83 | 5,49 | 5,42 | 4,93 | 5,82 | 5,63 | 5,33 |
| | 3° | 7,71 | 5,46 | 4,64 | 5,72 | 4,85 | 5,69 | 5,11 | 5,69 | 5,26 | 5,49 | 5,29 | 5 |
| | 4° | 7,89 | 5,82 | 4,51 | 5,96 | 4,4 | 6,21 | 5,6 | 5,97 | 5,18 | 5,40 | 5,21 | 5,47 |
| | 5° | 6,87 | 6,14 | 5,27 | 5,94 | 5,06 | 6,07 | 5,08 | 6,03 | 4,96 | 5,85 | 5,53 | 5,3 |
| | *μ | 7,39 | 5,69 | 4,88 | 5,79 | 4,71 | 5,99 | 5,29 | 5,99 | 5,29 | 5,65 | 5,43 | 5,24 |
| <i>Pseud. aer.</i> Ais.Clin. | 1° | 7,25 | 6,24 | 5,24 | 5,31 | 4,49 | 6,02 | 5,14 | 5,95 | 6,31 | 5,86 | 5,58 | 5,12 |
| | 2° | 7,56 | 6,3 | 5,09 | 5,79 | 4,97 | 6,31 | 5,27 | 6,1 | 6,18 | 5,93 | 5,65 | 5,4 |
| | 3° | 7,49 | 5,91 | 4,77 | 5,67 | 4,91 | 6,1 | 5,54 | 6,46 | 5,92 | 5,61 | 5,42 | 5,63 |
| | 4° | 7,38 | 6,11 | 4,9 | 5,43 | 4,6 | 5,94 | 5,03 | 6,13 | 5,84 | 5,49 | 5,33 | 5,01 |
| | 5° | 7,47 | 6,34 | 5,05 | 5,75 | 5,03 | 6,23 | 5,47 | 6,41 | 5,75 | 6,01 | 5,57 | 5,04 |
| | *μ | 7,43 | 6,18 | 5,01 | 5,59 | 4,80 | 6,12 | 5,29 | 6,12 | 5,29 | 5,78 | 5,51 | 5,24 |
| <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> SG1 | 1° | 7,59 | 6,86 | | 6,29 | | 6,18 | | 6,2 | | 6,16 | | 6,46 |
| | 2° | 7,86 | 6,49 | | 6,41 | | 6,37 | | 6,48 | | 6,48 | | 6,06 |
| | 3° | 7,9 | 6,62 | | 6,95 | | 6,8 | | 6,04 | | 6,54 | | 6,33 |
| | 4° | 7,61 | 6,83 | | 6,8 | | 6,89 | | 6,31 | | 6,19 | | 5,92 |
| | 5° | 7,99 | 6,95 | | 6,85 | | 6,06 | | 6,87 | | 6,08 | | 6,58 |
| | **μ | 7,79 | 6,75 | | 6,66 | | 6,46 | | 6,38 | | 6,29 | | 6,27 |

*μ = valor utilizado para la expresión gráfica en las curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana

**μ = la exposición a las aguas de la *L. pneumophila* ha sido de 48, 72, 96 y 120 horas.

NÚMERO DE EXPERIMENTO Y EXPRESIÓN LOGARÍTMICA DEL RECUENTO DE GÉRMENES **TRAS 24ª HORAS DE EXPOSICIÓN A LAS AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|---|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) ATCC | 1º | 8,60 | 6,82 | 5,17 | 6,58 | 5,31 | 6,49 | 5,74 | 6,23 | 5,08 | 5,39 | 4,68 | 5,37 |
| | 2º | 8,00 | 6,68 | 5,00 | 6,34 | 5,26 | 6,27 | 5,59 | 6,19 | 5,22 | 5,45 | 4,80 | 5,14 |
| | 3º | 7,81 | 6,15 | 4,77 | 6,15 | 5,07 | 6,17 | 5,38 | 5,85 | 4,76 | 5,26 | 4,49 | 4,99 |
| | 4º | 7,60 | 6,04 | 4,54 | 6,07 | 4,99 | 6,11 | 5,17 | 5,67 | 4,59 | 5,13 | 4,35 | 4,65 |
| | 5º | 7,64 | 6,06 | 4,97 | 6,01 | 5,32 | 6,06 | 5,77 | 5,96 | 4,90 | 5,42 | 4,83 | 4,90 |
| | *µ | 7,93 | 6,35 | 4,89 | 6,23 | 5,19 | 6,22 | 5,53 | 5,98 | 4,91 | 5,33 | 4,63 | 5,01 |
| <i>Stafilo.aur.</i> Coag (+) Ais.Clin | 1º | 8,25 | 6,43 | 5,15 | 6,51 | 5,79 | 5,89 | 5,00 | 5,86 | 4,91 | 5,71 | 5,59 | 5,05 |
| | 2º | 8,17 | 6,21 | 5,07 | 6,34 | 5,65 | 5,73 | 4,86 | 5,92 | 5,00 | 5,78 | 5,67 | 4,89 |
| | 3º | 8,00 | 6,05 | 4,97 | 6,09 | 5,34 | 5,54 | 4,73 | 5,41 | 4,64 | 5,49 | 5,43 | 4,62 |
| | 4º | 7,97 | 5,97 | 4,65 | 6,00 | 5,10 | 5,29 | 4,59 | 5,29 | 4,42 | 5,43 | 5,36 | 4,34 |
| | 5º | 8,16 | 6,09 | 4,56 | 5,71 | 5,82 | 5,80 | 4,67 | 5,77 | 4,93 | 5,84 | 5,55 | 5,00 |
| | *µ | 8,11 | 6,15 | 4,88 | 6,13 | 5,54 | 5,65 | 4,77 | 5,65 | 4,78 | 5,65 | 5,52 | 4,78 |
| <i>E.coli</i> ATCC | 1º | 7,31 | 5,89 | 4,78 | 6,18 | 5,57 | 5,97 | 4,73 | 6,17 | 5,78 | 5,47 | 5,15 | 4,89 |
| | 2º | 7,38 | 5,97 | 4,93 | 6,34 | 5,73 | 6,00 | 4,89 | 6,25 | 5,84 | 5,60 | 5,28 | 5,00 |
| | 3º | 7,03 | 6,00 | 4,54 | 5,97 | 5,31 | 5,76 | 4,37 | 5,98 | 5,50 | 5,24 | 4,99 | 5,15 |
| | 4º | 6,95 | 5,58 | 4,29 | 5,75 | 5,19 | 5,69 | 4,25 | 5,85 | 5,39 | 5,17 | 4,91 | 4,68 |
| | 5º | 7,28 | 5,46 | 4,56 | 6,01 | 5,35 | 5,63 | 4,54 | 5,95 | 5,54 | 5,07 | 4,97 | 4,43 |
| | *µ | 7,19 | 5,78 | 4,62 | 6,05 | 5,43 | 5,81 | 4,56 | 6,04 | 5,61 | 5,31 | 5,06 | 4,83 |
| <i>E.coli</i> Ais.Clin. | 1º | 7,42 | 6,18 | 5,00 | 6,28 | 5,83 | 6,27 | 6,37 | 5,97 | 4,89 | 5,19 | 5,58 | 5,28 |
| | 2º | 7,50 | 6,25 | 5,19 | 6,41 | 5,89 | 6,39 | 6,51 | 6,14 | 4,96 | 5,24 | 4,65 | 5,34 |
| | 3º | 7,18 | 5,97 | 4,78 | 6,10 | 5,64 | 6,03 | 6,18 | 5,59 | 4,58 | 4,79 | 4,32 | 4,97 |
| | 4º | 7,07 | 5,78 | 4,62 | 5,97 | 5,38 | 5,95 | 6,09 | 5,53 | 4,37 | 4,71 | 4,28 | 4,86 |
| | 5º | 6,98 | 6,17 | 5,06 | 5,94 | 5,81 | 6,01 | 5,90 | 5,92 | 5,00 | 4,82 | 4,52 | 5,05 |
| | *µ | 7,23 | 6,07 | 4,93 | 6,14 | 5,71 | 6,13 | 5,65 | 5,85 | 4,76 | 4,95 | 4,47 | 5,10 |

Bloque -I-

| | Experimento Número | Caldo Nutritivo | Ag.S.S.H. | Ag. Red | Ag.Bicarb | Ag. Red | Ag.Carbog | Ag. Red | Ag.Oligo | Ag. Red | Ag.Rad | Ag. Red | Ag.Dest |
|--|-----------------------|--------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | 1° | 7,00 | 5,78 | 4,87 | 5,85 | 4,49 | 5,89 | 5,35 | 5,57 | 5,10 | 5,54 | 4,85 | 5,17 |
| | 2° | 7,15 | 5,89 | 4,98 | 5,97 | 4,57 | 5,95 | 5,47 | 5,69 | 5,23 | 5,69 | 4,97 | 5,29 |
| | 3° | 6,86 | 5,53 | 4,61 | 5,60 | 4,29 | 5,64 | 5,12 | 5,33 | 4,85 | 5,28 | 4,69 | 4,98 |
| | 4° | 6,73 | 5,41 | 4,48 | 5,49 | 4,17 | 5,52 | 4,99 | 5,20 | 4,72 | 5,17 | 4,53 | 4,85 |
| | 5° | 6,91 | 5,39 | 4,76 | 5,69 | 4,48 | 5,85 | 5,17 | 5,26 | 5,00 | 5,37 | 4,86 | 4,96 |
| | *μ | 6,93 | 5,60 | 4,74 | 5,72 | 4,40 | 5,77 | 5,22 | 5,41 | 4,98 | 5,41 | 4,78 | 5,05 |
| <i>Pseud. aer.</i> Ais.Clín. | 1° | 7,02 | 6,12 | 4,63 | 5,78 | 4,76 | 6,08 | 5,43 | 5,86 | 5,37 | 5,87 | 5,55 | 5,19 |
| | 2° | 7,18 | 6,27 | 4,76 | 5,91 | 4,89 | 6,21 | 5,56 | 5,98 | 5,49 | 5,98 | 5,63 | 5,27 |
| | 3° | 6,85 | 5,98 | 4,39 | 5,54 | 4,53 | 5,83 | 5,21 | 5,59 | 5,13 | 5,62 | 5,31 | 5,03 |
| | 4° | 6,72 | 5,79 | 4,31 | 5,39 | 4,40 | 5,69 | 5,10 | 5,43 | 5,02 | 5,48 | 5,19 | 4,97 |
| | 5° | 6,88 | 5,84 | 4,46 | 5,48 | 4,62 | 6,04 | 5,20 | 5,79 | 5,04 | 5,80 | 5,67 | 5,09 |
| | *μ | 6,93 | 6,00 | 4,51 | 5,62 | 4,64 | 5,97 | 5,30 | 5,73 | 5,21 | 5,75 | 5,47 | 5,11 |
| <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> SG1 | 1° | 7,69 | 6,83 | | 6,67 | | 6,41 | | 6,41 | | 6,35 | | 6,18 |
| | 2° | 7,81 | 6,95 | | 6,79 | | 6,55 | | 6,57 | | 6,47 | | 6,31 |
| | 3° | 7,50 | 6,58 | | 6,43 | | 6,23 | | 6,18 | | 6,15 | | 5,97 |
| | 4° | 7,38 | 6,47 | | 6,31 | | 6,11 | | 6,05 | | 6,07 | | 5,84 |
| | 5° | 7,67 | 6,72 | | 6,60 | | 6,35 | | 6,24 | | 6,11 | | 6,00 |
| | **μ | 7,61 | 6,71 | | 6,56 | | 6,33 | | 6,29 | | 6,23 | | 6,06 |

* μ = valor utilizado para la expresión gráfica en las curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana

** μ = la incubación de la *L. pneumophila* ha sido de 48, 72, 96 y 120 horas.

BLOQUE DE TABLAS -II-
(nº total de tablas 34)

**REDUCCIÓN DEL INÓCULO INICIAL (RII), PORCENTAJE DE REDUCCIÓN
Y EXPRESIÓN GRÁFICA DE LAS CURVAS PROMEDIO DE VEGETATIVIDAD
CRECIMIENTO-LETALIDAD MICROBIANA EN EXPRESIÓN LOGARÍTMICA**

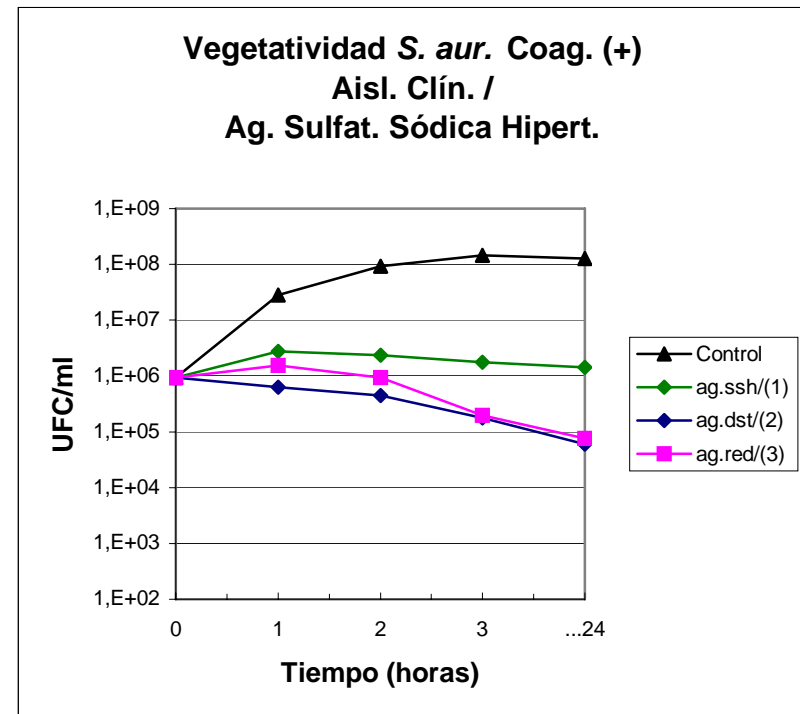
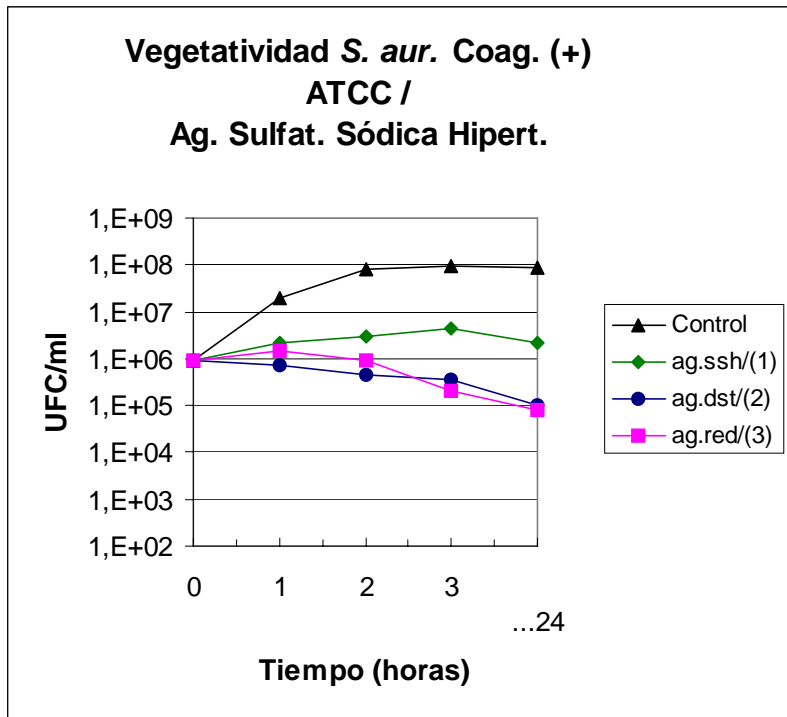
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,35 | 5,87 | 6,16 |
| 2 | 7,92 | 6,46 | 5,65 | 5,98 |
| 3 | 7,97 | 6,64 | 5,54 | 5,30 |
| ...24 | 7,93 | 6,35 | 5,01 | 4,89 |
| RII | -1,96 | -0,38 | 0,96 | 1,07 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,44 | 5,79 | 6,18 |
| 2 | 7,97 | 6,42 | 5,65 | 5,97 |
| 3 | 8,16 | 6,25 | 5,24 | 5,29 |
| ...24 | 8,11 | 6,15 | 4,78 | 4,88 |
| RII | -2,19 | -0,19 | 1,19 | 1,09 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 2,24E+06 | 7,37E+05 | 1,45E+06 |
| 2 | 8,38E+07 | 2,87E+06 | 4,43E+05 | 9,48E+05 |
| 3 | 9,25E+07 | 4,40E+06 | 3,45E+05 | 2,00E+05 |
| ...24 | 8,45E+07 | 2,25E+06 | 1,03E+05 | 7,83E+04 |
| % Reducción: | -8986,02 | -141,94 | 88,92 | 91,59 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|-----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 2,73E+06 | 6,23E+05 | 1,53E+06 |
| 2 | 9,25E+07 | 2,65E+06 | 4,43E+05 | 9,29E+05 |
| 3 | 1,44E+08 | 1,77E+06 | 1,75E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 1,28E+08 | 1,43E+06 | 6,00E+04 | 7,50E+04 |
| % Reducción: | -13609,68 | -53,23 | 93,55 | 91,94 |



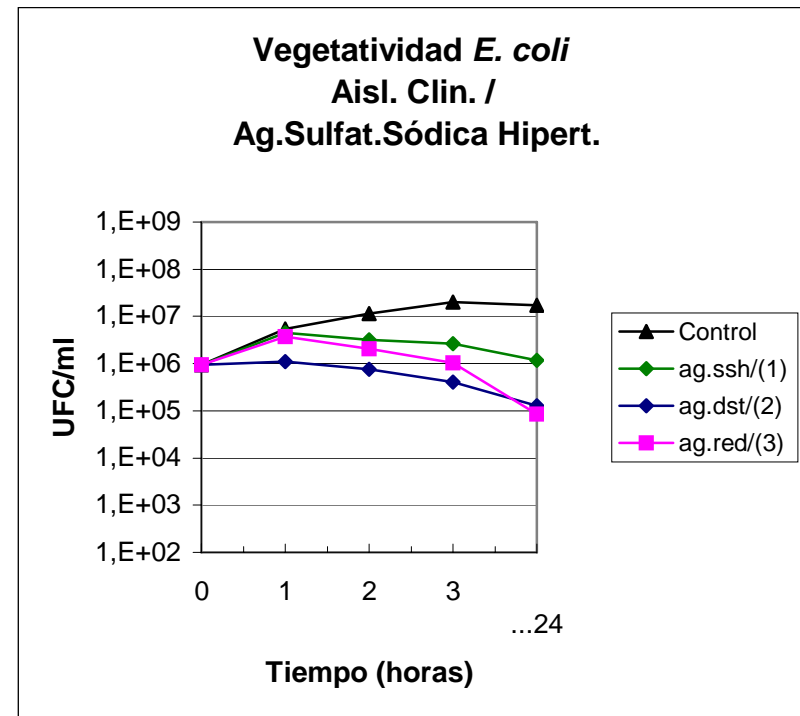
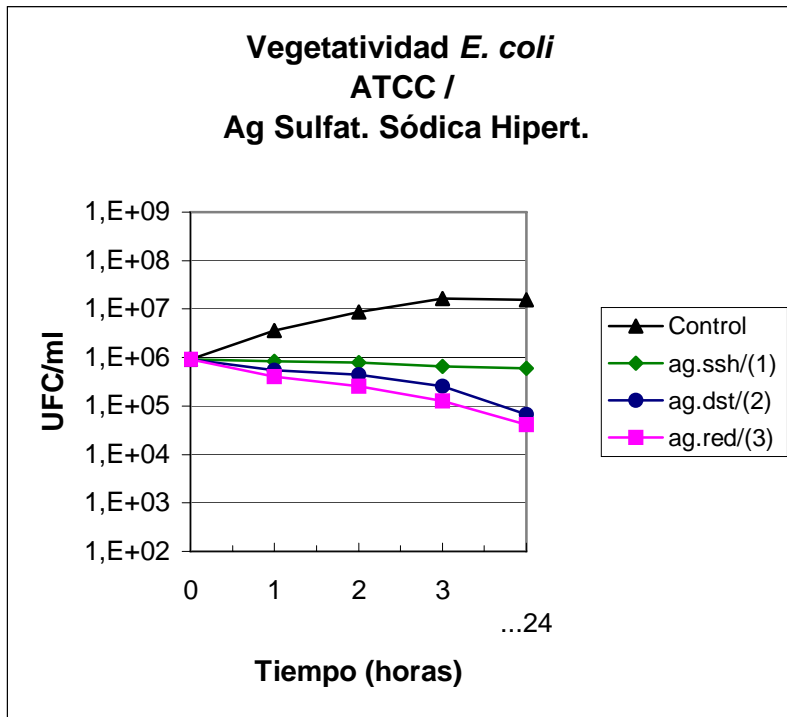
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 5,92 | 5,73 | 5,61 |
| 2 | 6,94 | 5,90 | 5,65 | 5,40 |
| 3 | 7,22 | 5,82 | 5,41 | 5,11 |
| ...24 | 7,19 | 5,78 | 4,83 | 4,62 |
| RII | -1,22 | 0,19 | 1,14 | 1,35 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 6,66 | 6,04 | 6,58 |
| 2 | 7,06 | 6,51 | 5,88 | 6,31 |
| 3 | 7,31 | 6,43 | 5,61 | 6,02 |
| ...24 | 7,23 | 6,07 | 5,10 | 4,93 |
| RII | -1,26 | -0,10 | 0,86 | 1,04 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 8,30E+05 | 5,42E+05 | 4,09E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 7,88E+05 | 4,43E+05 | 2,53E+05 |
| 3 | 1,66E+07 | 6,62E+05 | 2,55E+05 | 1,28E+05 |
| ...24 | 1,55E+07 | 6,07E+05 | 6,75E+04 | 4,13E+04 |
| % Reducción: | -1566,67 | 34,71 | 92,74 | 95,56 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 4,56E+06 | 1,11E+06 | 3,78E+06 |
| 2 | 1,14E+07 | 3,21E+06 | 7,60E+05 | 2,05E+06 |
| 3 | 2,04E+07 | 2,68E+06 | 4,03E+05 | 1,05E+06 |
| ...24 | 1,71E+07 | 1,18E+06 | 1,27E+05 | 8,45E+04 |
| % Reducción: | -1738,71 | -27,24 | 86,31 | 90,91 |



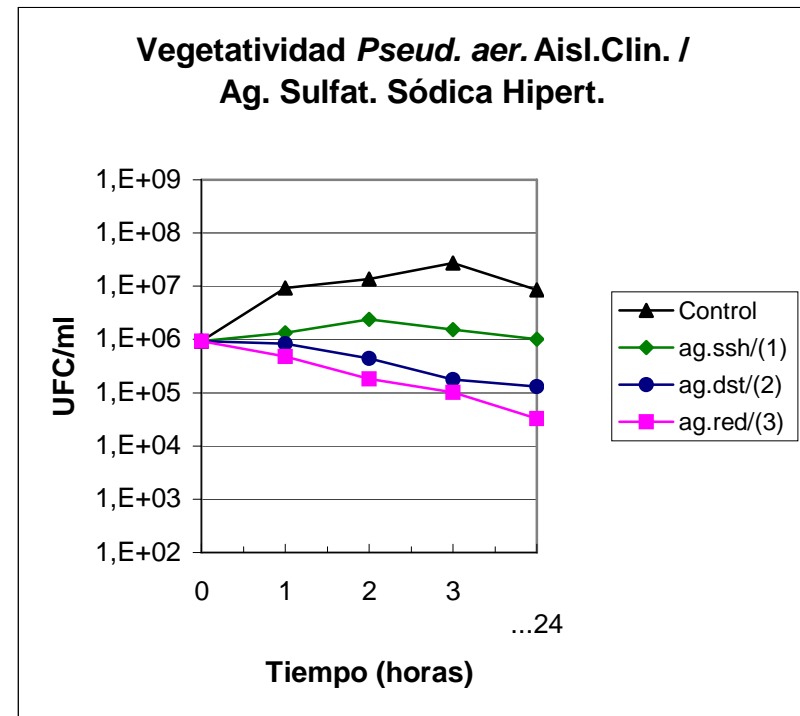
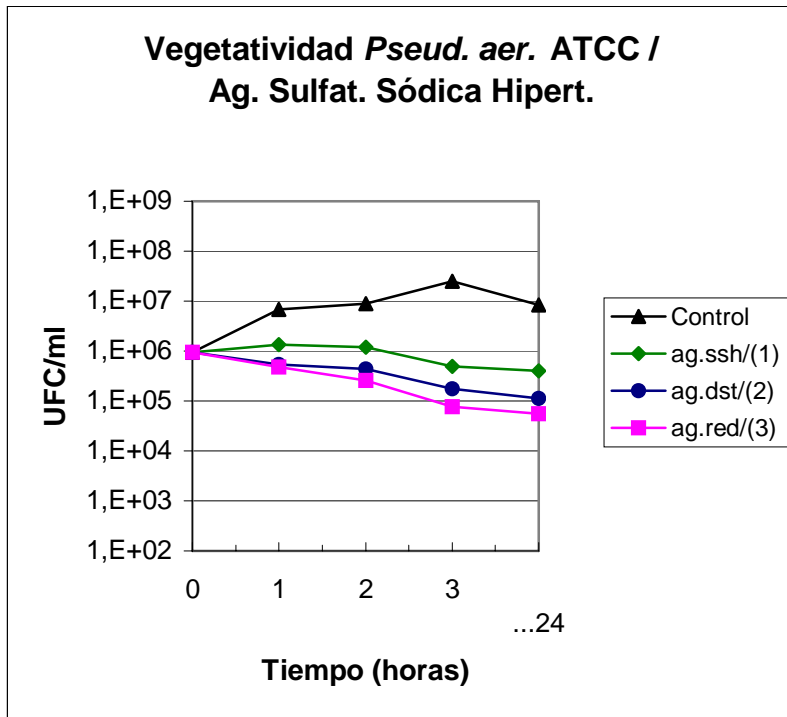
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 6,13 | 5,73 | 5,68 |
| 2 | 6,94 | 6,08 | 5,65 | 5,41 |
| 3 | 7,39 | 5,69 | 5,24 | 4,88 |
| ...24 | 6,93 | 5,60 | 5,05 | 4,74 |
| RII | -0,96 | 0,37 | 0,92 | 1,23 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 6,13 | 5,93 | 5,67 |
| 2 | 7,14 | 6,38 | 5,65 | 5,26 |
| 3 | 7,43 | 6,18 | 5,24 | 5,01 |
| ...24 | 6,93 | 6,00 | 5,11 | 4,51 |
| RII | -0,96 | -0,03 | 0,86 | 1,45 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 1,34E+06 | 5,38E+05 | 4,83E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,20E+06 | 4,43E+05 | 2,58E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 4,87E+05 | 1,75E+05 | 7,67E+04 |
| ...24 | 8,50E+06 | 3,98E+05 | 1,12E+05 | 5,53E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 57,22 | 87,99 | 94,06 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 1,35E+06 | 8,45E+05 | 4,73E+05 |
| 2 | 1,38E+07 | 2,38E+06 | 4,43E+05 | 1,83E+05 |
| 3 | 2,70E+07 | 1,51E+06 | 1,75E+05 | 1,02E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 1,00E+06 | 1,29E+05 | 3,27E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | -7,89 | 86,09 | 96,49 |



Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst./(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,70 | 5,87 | 6,40 |
| 2 | 7,92 | 6,50 | 5,65 | 6,06 |
| 3 | 7,97 | 6,40 | 5,54 | 5,86 |
| ...24 | 7,93 | 6,23 | 5,01 | 5,19 |

RII -1,96 -0,26 0,96 0,78

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst./(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,50 | 5,79 | 6,22 |
| 2 | 7,97 | 6,54 | 5,65 | 6,18 |
| 3 | 8,16 | 6,45 | 5,24 | 6,22 |
| ...24 | 8,11 | 6,13 | 4,78 | 5,54 |

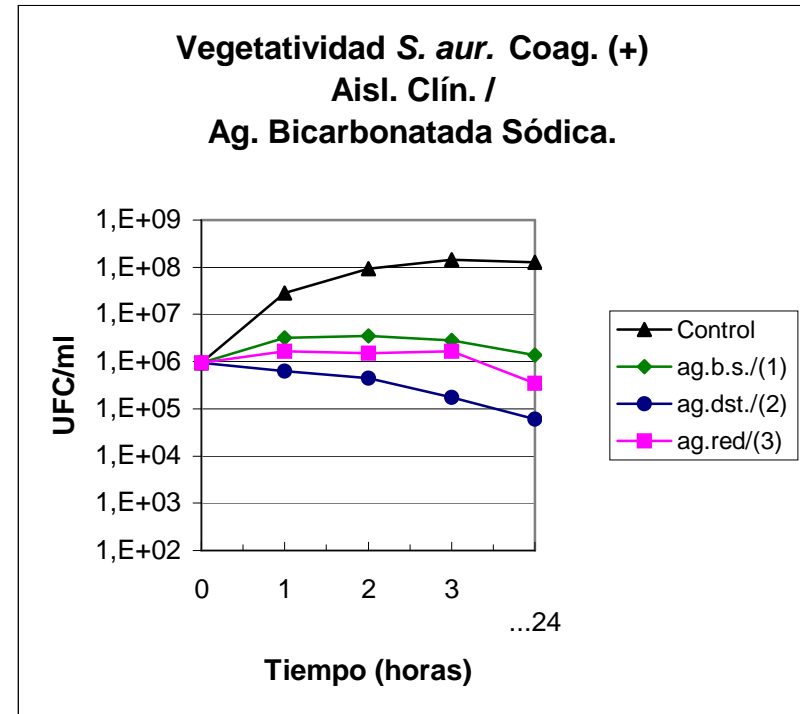
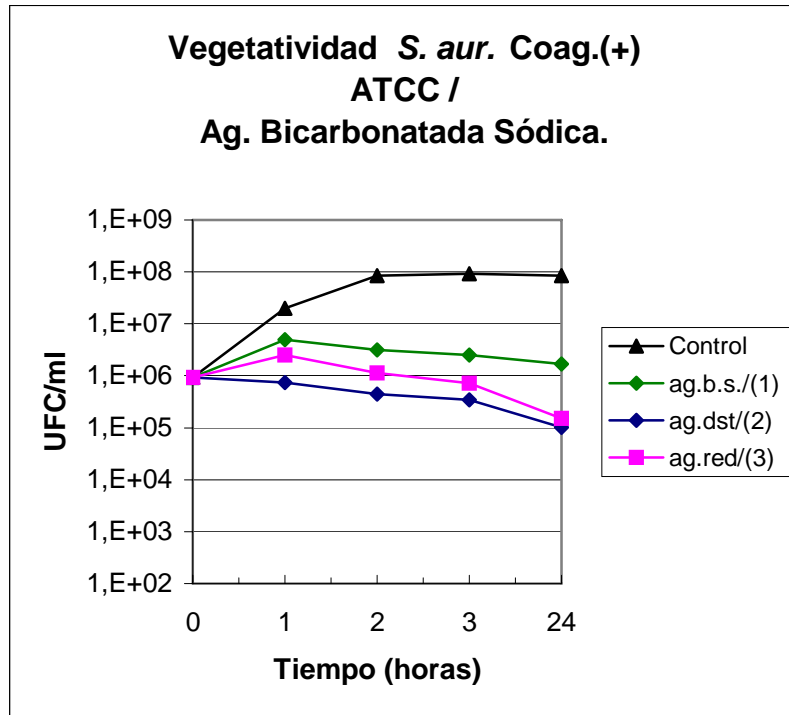
RII -2,14 -0,16 1,19 0,43

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst./(2) | ag.red/(3) |
|--------|----------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 5,00E+06 | 7,37E+05 | 2,50E+06 |
| 2 | 8,38E+07 | 3,15E+06 | 4,43E+05 | 1,14E+06 |
| 3 | 9,25E+07 | 2,51E+06 | 3,45E+05 | 7,25E+05 |
| ...24 | 8,45E+07 | 1,70E+06 | 1,03E+05 | 1,53E+05 |

% Reducción: -8986,02 -83,15 88,92 83,51

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst./(2) | ag.red/(3) |
|--------|----------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 3,18E+06 | 6,23E+05 | 1,65E+06 |
| 2 | 9,25E+07 | 3,50E+06 | 4,43E+05 | 1,53E+06 |
| 3 | 1,44E+08 | 2,85E+06 | 1,75E+05 | 1,66E+06 |
| ...24 | 1,28E+08 | 1,36E+06 | 6,00E+04 | 3,43E+05 |

% Reducción: -13609,68 -46,06 93,55 63,08



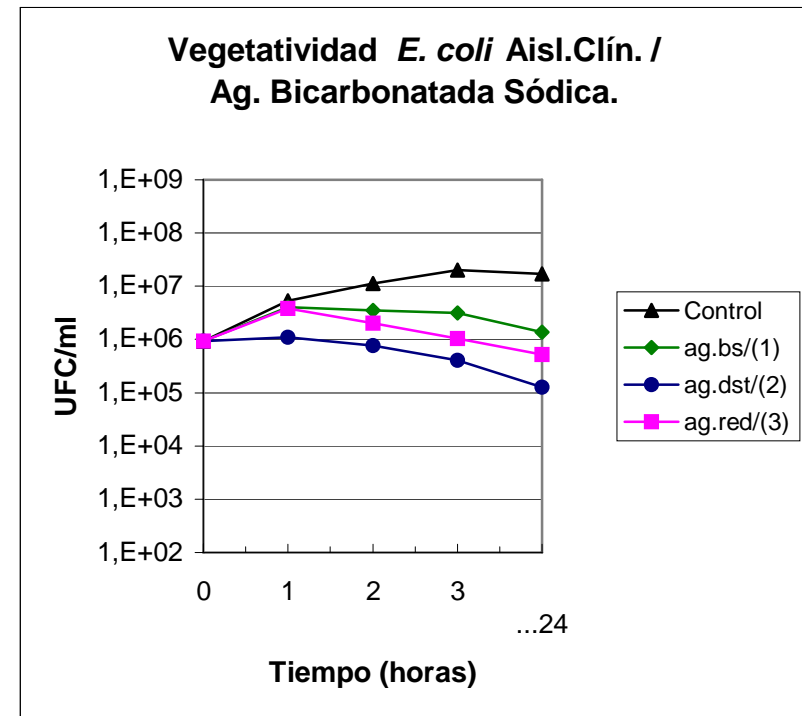
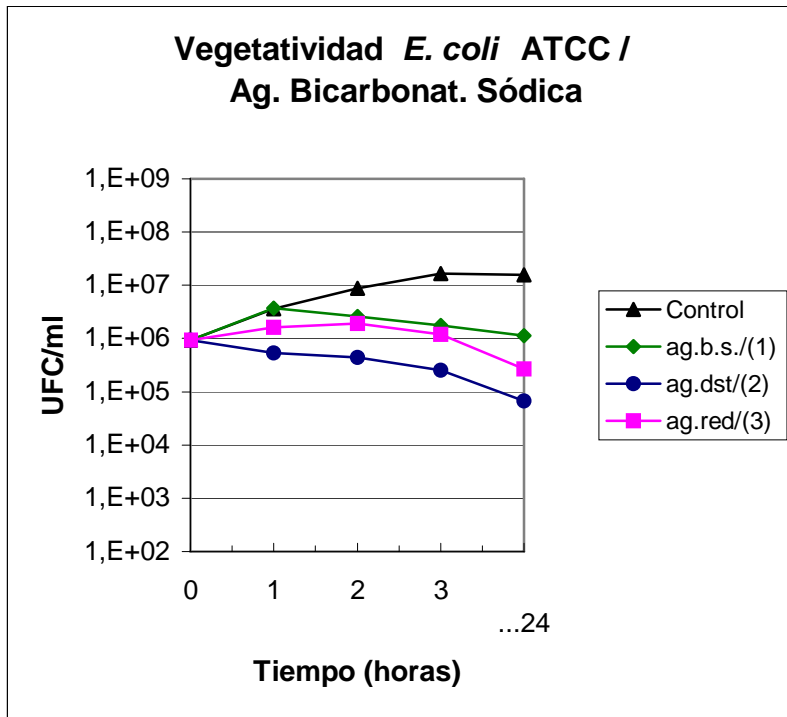
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red(3) |
|--------|---------|-------------|------------|-----------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 6,57 | 5,73 | 6,21 |
| 2 | 6,94 | 6,42 | 5,65 | 6,28 |
| 3 | 7,22 | 6,24 | 5,41 | 6,08 |
| ...24 | 7,19 | 6,05 | 4,83 | 5,43 |
| RII | -1,22 | -0,08 | 1,14 | 0,53 |

| Tiempo | Control | ag.bs/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|-----------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 6,61 | 6,04 | 6,58 |
| 2 | 7,06 | 6,55 | 5,88 | 6,31 |
| 3 | 7,31 | 6,49 | 5,61 | 6,02 |
| ...24 | 7,23 | 6,14 | 5,10 | 5,71 |
| RII | -1,26 | -0,17 | 0,86 | 0,26 |

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|-------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 3,68E+06 | 5,42E+05 | 1,63E+06 |
| 2 | 8,80E+06 | 2,60E+06 | 4,43E+05 | 1,89E+06 |
| 3 | 1,66E+07 | 1,75E+06 | 2,55E+05 | 1,20E+06 |
| ...24 | 1,55E+07 | 1,12E+06 | 6,75E+04 | 2,72E+05 |
| % Reducción: | -1566,67 | -20,50 | 92,74 | 70,81 |

| Tiempo | Control | ag.bs/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|-----------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 4,08E+06 | 1,11E+06 | 3,78E+06 |
| 2 | 1,14E+07 | 3,55E+06 | 7,60E+05 | 2,05E+06 |
| 3 | 2,04E+07 | 3,13E+06 | 4,03E+05 | 1,05E+06 |
| ...24 | 1,71E+07 | 1,39E+06 | 1,27E+05 | 5,17E+05 |
| % Reducción: | -1738,71 | -48,92 | 86,31 | 44,44 |



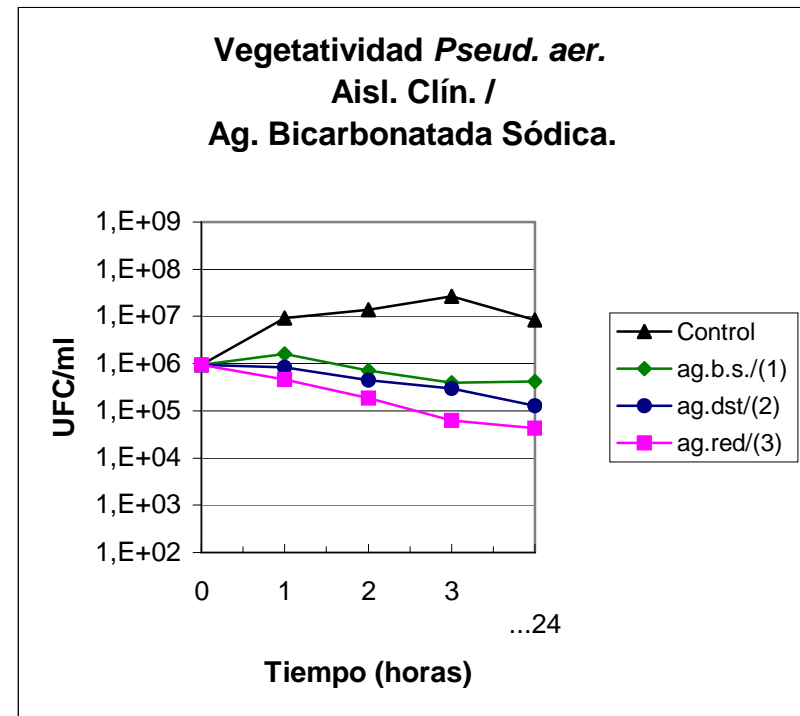
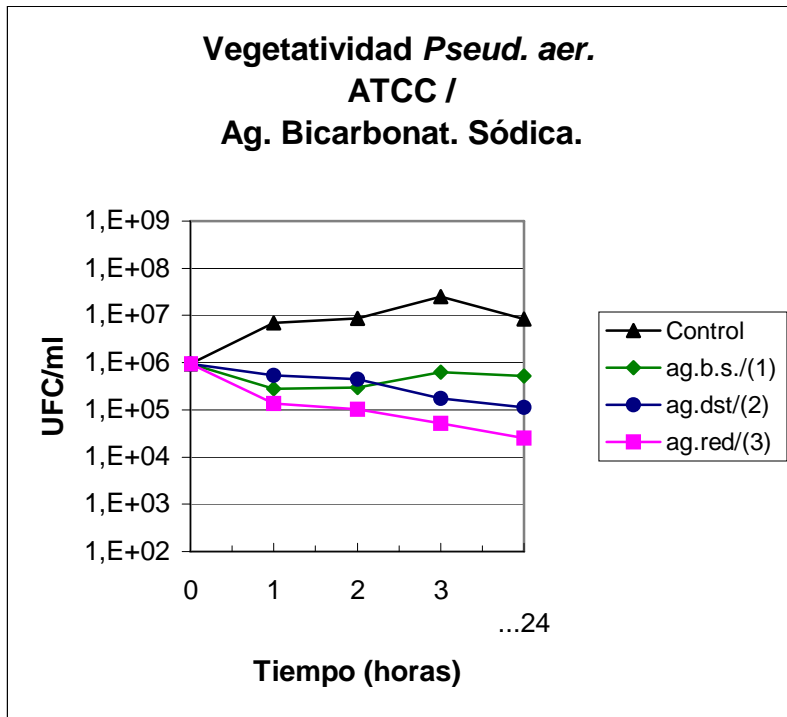
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|-------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 5,45 | 5,73 | 5,13 |
| 2 | 6,94 | 5,47 | 5,65 | 5,01 |
| 3 | 7,39 | 5,79 | 5,24 | 4,71 |
| ...24 | 6,93 | 5,72 | 5,05 | 4,40 |
| RII | -0,96 | 0,25 | 0,92 | 1,57 |

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|-------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 2,79E+05 | 5,38E+05 | 1,35E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 2,96E+05 | 4,43E+05 | 1,01E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 6,20E+05 | 1,75E+05 | 5,15E+04 |
| ...24 | 8,50E+06 | 5,21E+05 | 1,12E+05 | 2,50E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 43,94 | 87,99 | 97,31 |

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|-------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 6,21 | 5,93 | 5,67 |
| 2 | 7,14 | 5,85 | 5,65 | 5,26 |
| 3 | 7,43 | 5,59 | 5,47 | 4,80 |
| ...24 | 6,93 | 5,62 | 5,11 | 4,64 |
| RII | -0,96 | 0,35 | 0,86 | 1,33 |

| Tiempo | Control | ag.b.s./(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|-------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 1,62E+06 | 8,45E+05 | 4,64E+05 |
| 2 | 1,38E+07 | 7,07E+05 | 4,43E+05 | 1,83E+05 |
| 3 | 2,70E+07 | 3,88E+05 | 2,98E+05 | 6,25E+04 |
| ...24 | 8,50E+06 | 4,18E+05 | 1,29E+05 | 4,33E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 55,02 | 86,09 | 95,34 |



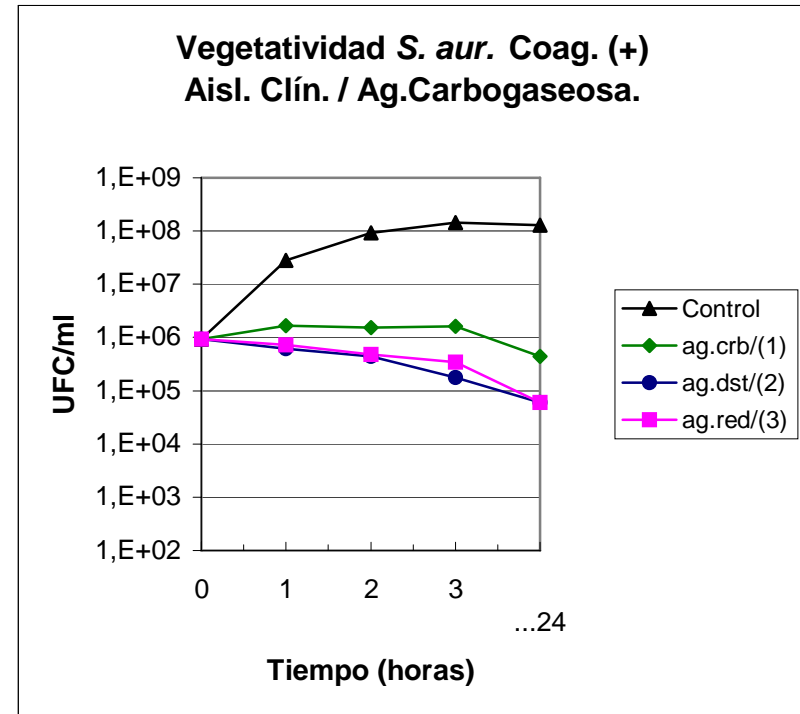
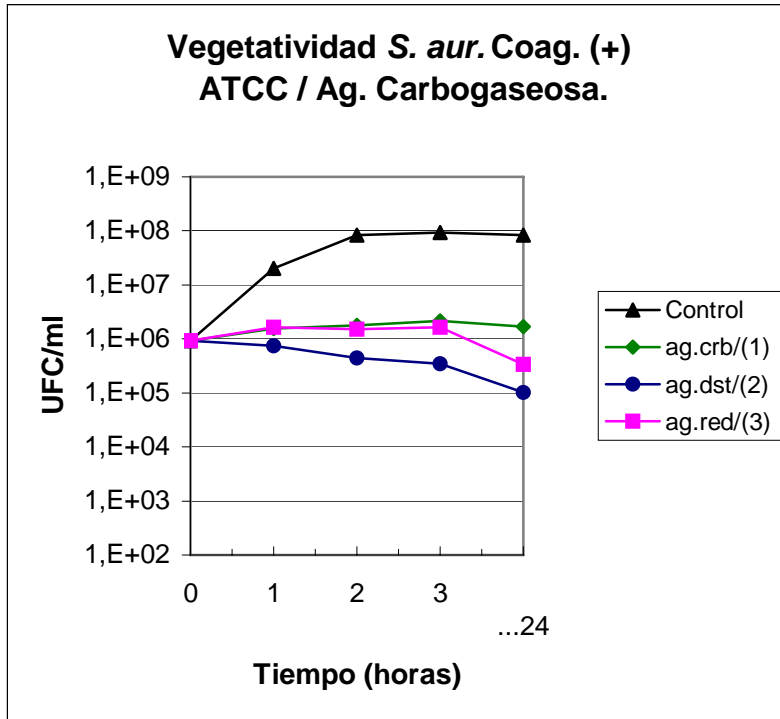
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,19 | 5,87 | 6,22 |
| 2 | 7,92 | 6,26 | 5,65 | 6,18 |
| 3 | 7,97 | 6,33 | 5,54 | 6,22 |
| ...24 | 7,93 | 6,22 | 5,01 | 5,53 |
| RII | -1,96 | -0,26 | 0,96 | 0,44 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,22 | 5,79 | 5,86 |
| 2 | 7,97 | 6,18 | 5,65 | 5,67 |
| 3 | 8,16 | 6,21 | 5,24 | 5,54 |
| ...24 | 8,11 | 5,65 | 4,78 | 4,77 |
| RII | -2,14 | 0,32 | 1,19 | 1,20 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 1,55E+06 | 7,37E+05 | 1,65E+06 |
| 2 | 8,38E+07 | 1,80E+06 | 4,43E+05 | 1,53E+06 |
| 3 | 9,25E+07 | 2,15E+06 | 3,45E+05 | 1,64E+06 |
| ...24 | 8,45E+07 | 1,68E+06 | 1,03E+05 | 3,42E+05 |
| % Reducción: | -8986,02 | -80,11 | 88,92 | 63,28 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|-----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 1,65E+06 | 6,23E+05 | 7,25E+05 |
| 2 | 9,25E+07 | 1,53E+06 | 4,43E+05 | 4,73E+05 |
| 3 | 1,44E+08 | 1,61E+06 | 1,75E+05 | 3,48E+05 |
| ...24 | 1,28E+08 | 4,46E+05 | 6,00E+04 | 5,93E+04 |
| % Reducción: | -13609,68 | 52,08 | 93,55 | 93,62 |



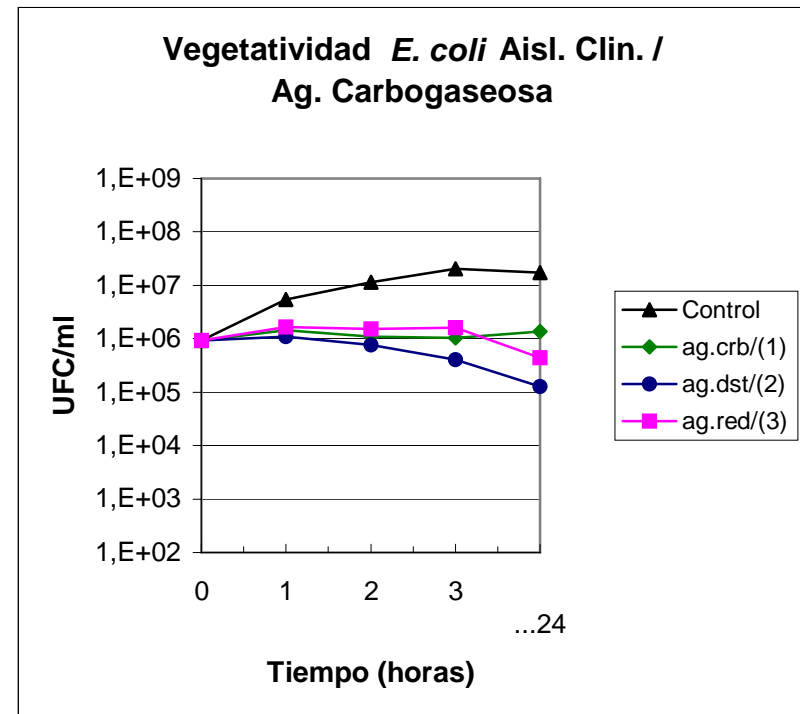
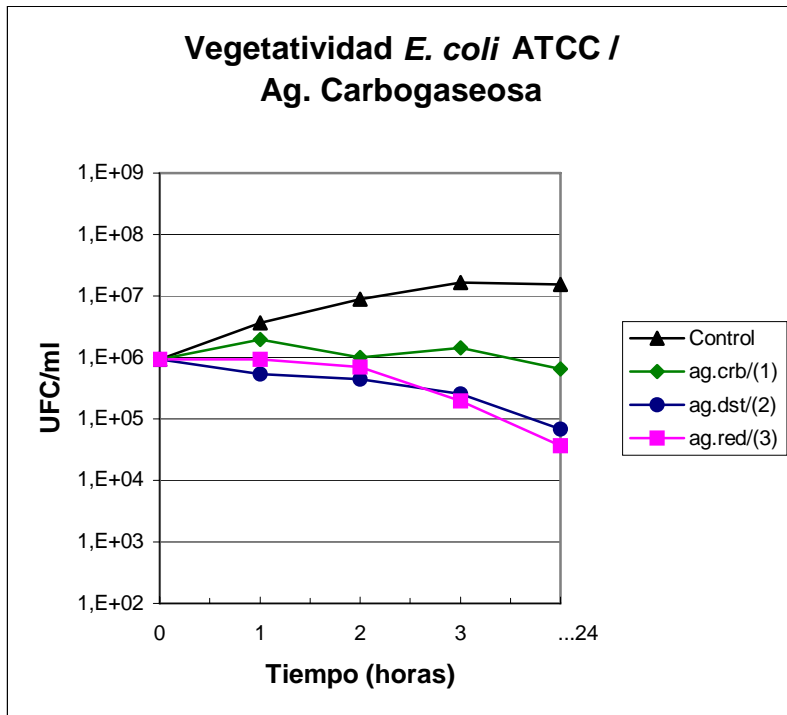
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 6,29 | 5,73 | 5,97 |
| 2 | 6,94 | 6,00 | 5,65 | 5,84 |
| 3 | 7,22 | 6,16 | 5,41 | 5,29 |
| ...24 | 7,19 | 5,81 | 4,83 | 4,56 |
| RII | -1,22 | 0,16 | 1,14 | 1,40 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 6,16 | 6,04 | 6,22 |
| 2 | 7,06 | 6,04 | 5,88 | 6,18 |
| 3 | 7,31 | 6,02 | 5,61 | 6,21 |
| ...24 | 7,23 | 6,13 | 5,10 | 5,65 |
| RII | -1,26 | -0,17 | 0,86 | 0,32 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 1,95E+06 | 5,42E+05 | 9,40E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,00E+06 | 4,43E+05 | 6,93E+05 |
| 3 | 1,66E+07 | 1,45E+06 | 2,55E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 1,55E+07 | 6,50E+05 | 6,75E+04 | 3,67E+04 |
| % Reducción: | -1566,67 | 30,11 | 92,74 | 96,06 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 1,45E+06 | 1,11E+06 | 1,65E+06 |
| 2 | 1,14E+07 | 1,10E+06 | 7,60E+05 | 1,53E+06 |
| 3 | 2,04E+07 | 1,05E+06 | 4,03E+05 | 1,61E+06 |
| ...24 | 1,71E+07 | 1,36E+06 | 1,27E+05 | 4,46E+05 |
| % Reducción: | -1738,71 | -46,51 | 86,31 | 52,08 |



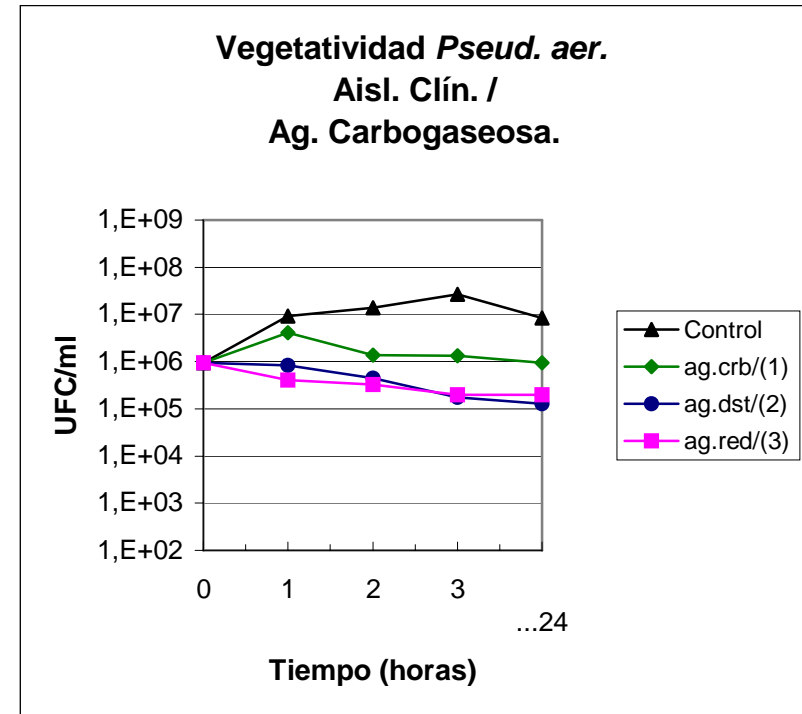
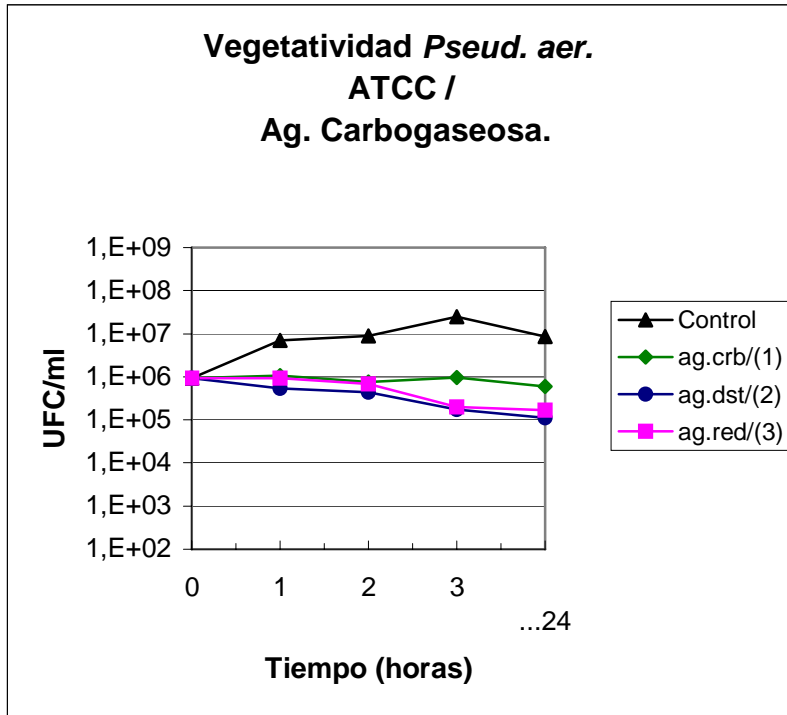
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 6,02 | 5,73 | 5,97 |
| 2 | 6,94 | 5,88 | 5,65 | 5,84 |
| 3 | 7,39 | 5,99 | 5,24 | 5,29 |
| ...24 | 6,93 | 5,77 | 5,05 | 5,22 |
| RII | -0,96 | 0,20 | 0,92 | 0,75 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 1,05E+06 | 5,38E+05 | 9,30E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 7,50E+05 | 4,43E+05 | 6,93E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 9,75E+05 | 1,75E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 5,88E+05 | 1,12E+05 | 1,66E+05 |
| % Reducción: | -813,98 | 36,83 | 87,99 | 82,17 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 6,61 | 5,93 | 5,61 |
| 2 | 7,14 | 6,13 | 5,65 | 5,52 |
| 3 | 7,43 | 6,12 | 5,24 | 5,29 |
| ...24 | 6,93 | 5,97 | 5,11 | 5,30 |
| RII | -0,96 | -0,01 | 0,86 | 0,67 |

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 4,03E+06 | 8,45E+05 | 4,03E+05 |
| 2 | 1,38E+07 | 1,36E+06 | 4,43E+05 | 3,28E+05 |
| 3 | 2,70E+07 | 1,32E+06 | 1,75E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 9,42E+05 | 1,29E+05 | 2,00E+05 |
| % Reducción: | -813,98 | -1,25 | 86,09 | 78,55 |



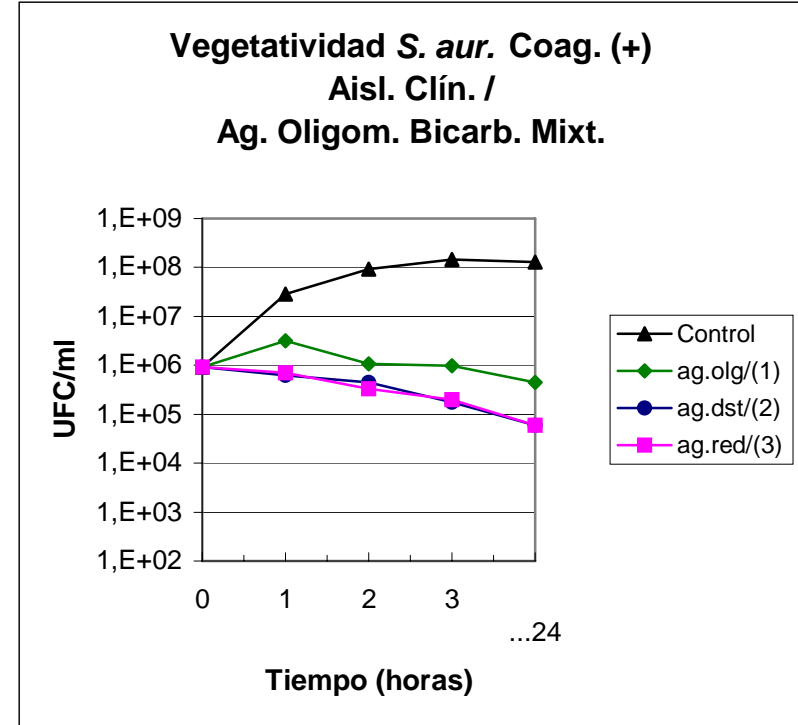
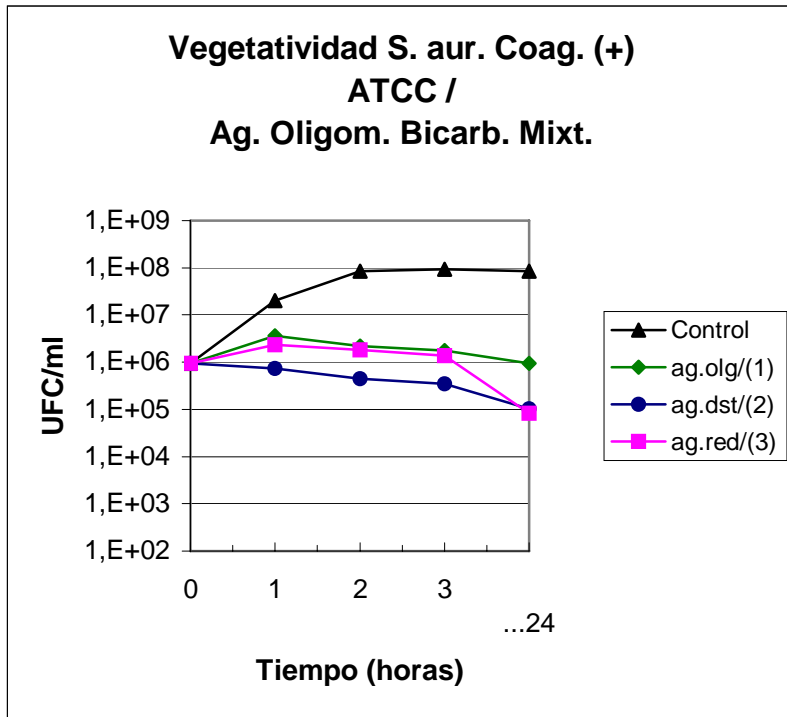
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,56 | 5,87 | 6,37 |
| 2 | 7,92 | 6,34 | 5,65 | 6,27 |
| 3 | 7,97 | 6,25 | 5,54 | 6,14 |
| ...24 | 7,93 | 5,98 | 5,01 | 4,91 |
| RII | -1,96 | -0,01 | 0,96 | 1,06 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 3,60E+06 | 7,37E+05 | 2,32E+06 |
| 2 | 8,38E+07 | 2,18E+06 | 4,43E+05 | 1,85E+06 |
| 3 | 9,25E+07 | 1,77E+06 | 3,45E+05 | 1,39E+06 |
| ...24 | 8,45E+07 | 9,58E+05 | 1,03E+05 | 8,14E+04 |
| % Reducción: | -8986,02 | -3,05 | 88,92 | 91,24 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,50 | 5,79 | 5,84 |
| 2 | 7,97 | 6,03 | 5,65 | 5,52 |
| 3 | 8,16 | 5,99 | 5,24 | 5,29 |
| ...24 | 8,11 | 5,65 | 4,78 | 4,78 |
| RII | -2,14 | 0,31 | 1,19 | 1,19 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|-----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 3,18E+06 | 6,23E+05 | 6,93E+05 |
| 2 | 9,25E+07 | 1,06E+06 | 4,43E+05 | 3,28E+05 |
| 3 | 1,44E+08 | 9,68E+05 | 1,75E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 1,28E+08 | 4,51E+05 | 6,00E+04 | 5,97E+04 |
| % Reducción: | -13609,68 | 51,47 | 93,55 | 93,58 |



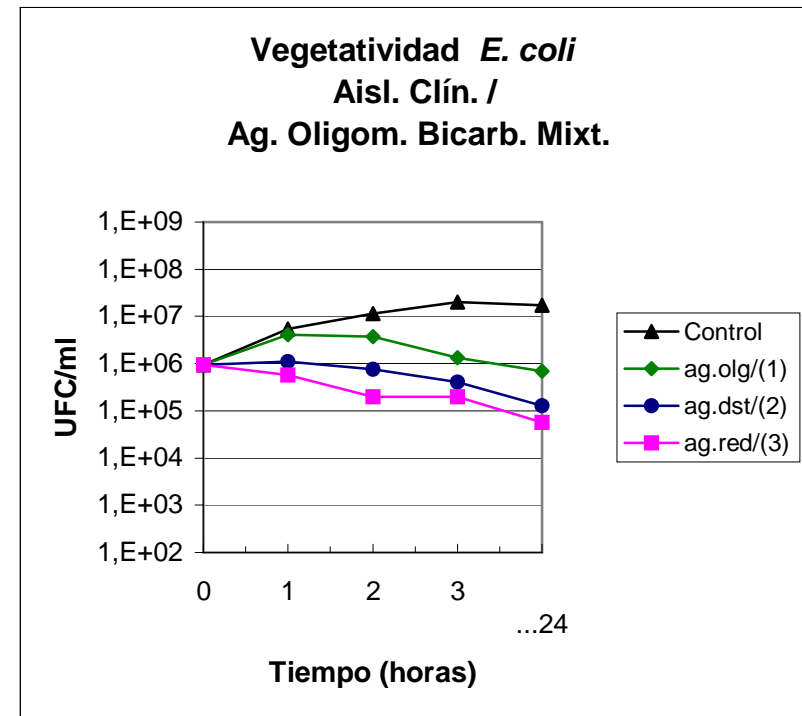
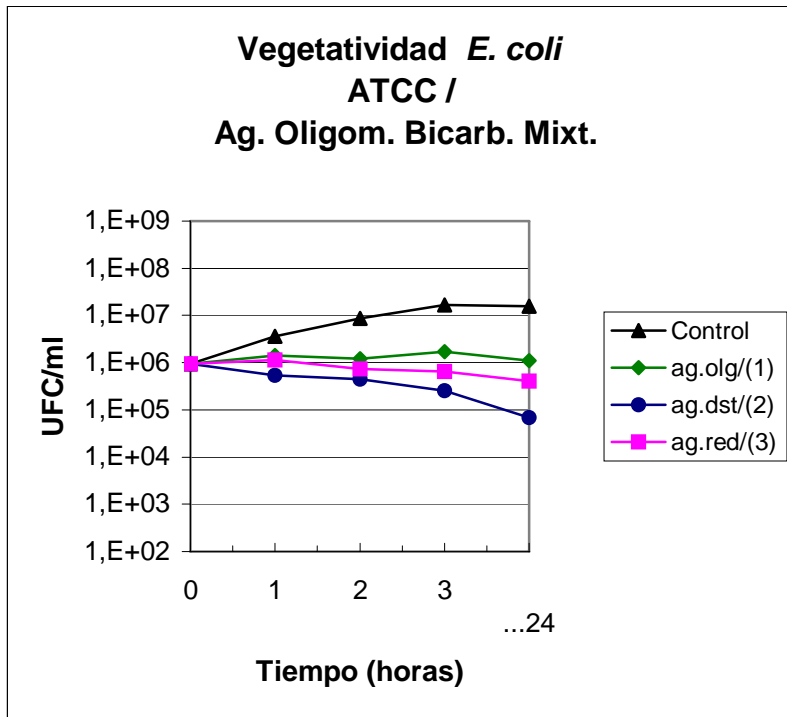
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 6,15 | 5,73 | 6,05 |
| 2 | 6,94 | 6,08 | 5,65 | 5,86 |
| 3 | 7,22 | 6,23 | 5,41 | 5,81 |
| ...24 | 7,19 | 6,04 | 4,83 | 5,61 |
| RII | -1,22 | -0,07 | 1,14 | 0,36 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 1,41E+06 | 5,42E+05 | 1,13E+06 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,20E+06 | 4,43E+05 | 7,26E+05 |
| 3 | 1,66E+07 | 1,71E+06 | 2,55E+05 | 6,42E+05 |
| ...24 | 1,55E+07 | 1,09E+06 | 6,75E+04 | 4,07E+05 |
| % Reducción: | -1566,67 | -16,94 | 92,74 | 56,20 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 6,62 | 6,04 | 5,75 |
| 2 | 7,06 | 6,57 | 5,88 | 5,29 |
| 3 | 7,31 | 6,13 | 5,61 | 5,30 |
| ...24 | 7,23 | 5,85 | 5,10 | 4,76 |
| RII | -1,26 | 0,12 | 0,86 | 1,21 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 4,13E+06 | 1,11E+06 | 5,64E+05 |
| 2 | 1,14E+07 | 3,75E+06 | 7,60E+05 | 1,97E+05 |
| 3 | 2,04E+07 | 1,34E+06 | 4,03E+05 | 1,98E+05 |
| ...24 | 1,71E+07 | 7,00E+05 | 1,27E+05 | 5,70E+04 |
| % Reducción: | -1738,71 | 24,73 | 86,31 | 93,87 |



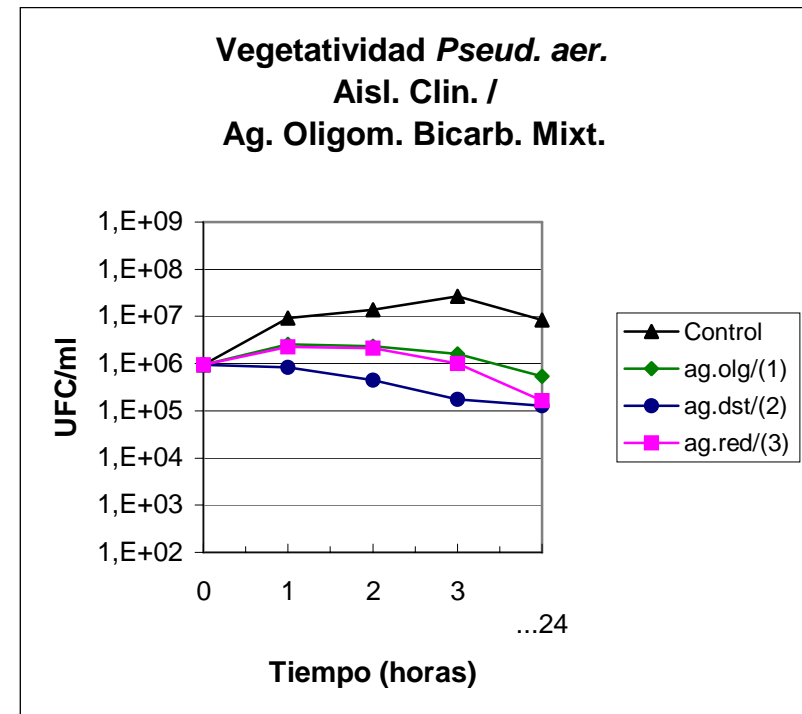
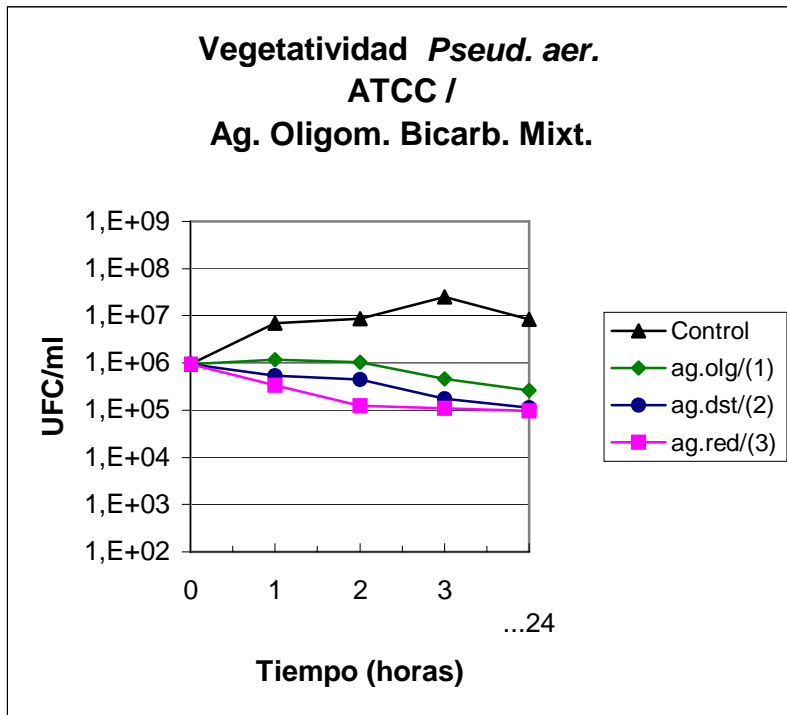
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 6,07 | 5,73 | 5,53 |
| 2 | 6,94 | 6,01 | 5,65 | 5,10 |
| 3 | 7,39 | 5,66 | 5,24 | 5,04 |
| ...24 | 6,93 | 5,41 | 5,05 | 4,98 |
| RII | -0,96 | 0,56 | 0,92 | 0,99 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 1,18E+06 | 5,38E+05 | 3,40E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,03E+06 | 4,43E+05 | 1,25E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 4,59E+05 | 1,75E+05 | 1,10E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 2,58E+05 | 1,12E+05 | 9,50E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 72,22 | 87,99 | 89,78 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 6,41 | 5,93 | 6,36 |
| 2 | 7,14 | 6,37 | 5,65 | 6,32 |
| 3 | 7,43 | 6,21 | 5,24 | 6,00 |
| ...24 | 6,93 | 5,73 | 5,11 | 5,21 |
| RII | -0,96 | 0,24 | 0,86 | 0,76 |

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 2,58E+06 | 8,45E+05 | 2,30E+06 |
| 2 | 1,38E+07 | 2,36E+06 | 4,43E+05 | 2,11E+06 |
| 3 | 2,70E+07 | 1,63E+06 | 1,75E+05 | 1,00E+06 |
| ...24 | 8,50E+06 | 5,36E+05 | 1,29E+05 | 1,63E+05 |
| % Reducción: | -813,98 | 42,42 | 86,09 | 82,44 |



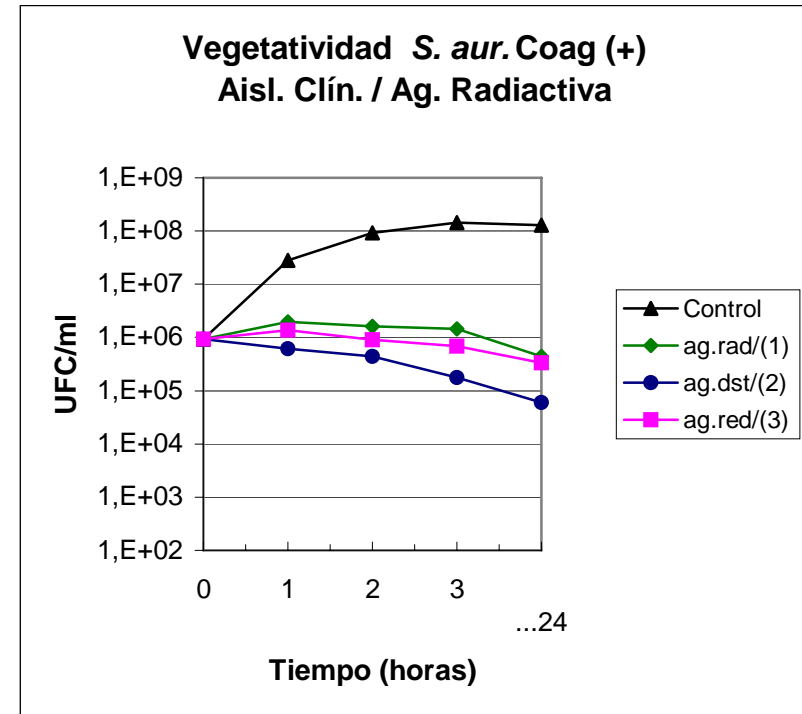
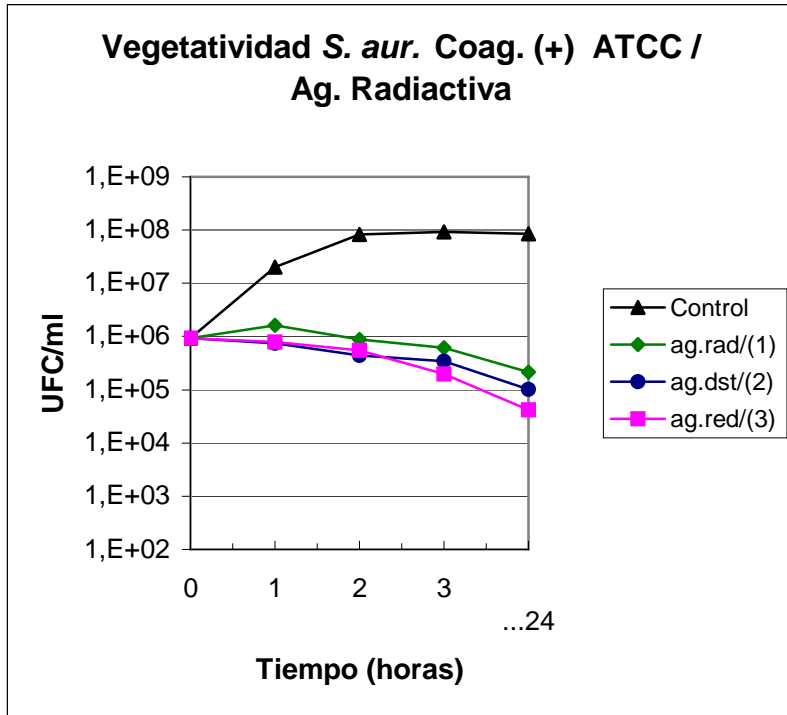
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,21 | 5,87 | 5,90 |
| 2 | 7,92 | 5,94 | 5,65 | 5,74 |
| 3 | 7,97 | 5,78 | 5,54 | 5,29 |
| ...24 | 7,93 | 5,33 | 5,01 | 4,63 |
| RII | -1,96 | 0,64 | 0,96 | 1,34 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 1,61E+06 | 7,37E+05 | 7,86E+05 |
| 2 | 8,38E+07 | 8,78E+05 | 4,43E+05 | 5,45E+05 |
| 3 | 9,25E+07 | 6,07E+05 | 3,45E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 8,45E+07 | 2,15E+05 | 1,03E+05 | 4,22E+04 |
| % Reducción: | -8986,02 | 76,92 | 88,92 | 95,46 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,29 | 5,79 | 6,14 |
| 2 | 7,97 | 6,21 | 5,65 | 5,96 |
| 3 | 8,16 | 6,16 | 5,24 | 5,84 |
| ...24 | 8,11 | 5,65 | 4,78 | 5,52 |
| RII | -2,14 | 0,32 | 1,19 | 0,44 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|-----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 1,95E+06 | 6,23E+05 | 1,37E+06 |
| 2 | 9,25E+07 | 1,64E+06 | 4,43E+05 | 9,08E+05 |
| 3 | 1,44E+08 | 1,44E+06 | 1,75E+05 | 6,92E+05 |
| ...24 | 1,28E+08 | 4,46E+05 | 6,00E+04 | 3,34E+05 |
| % Reducción: | -13609,68 | 52,08 | 93,55 | 64,07 |



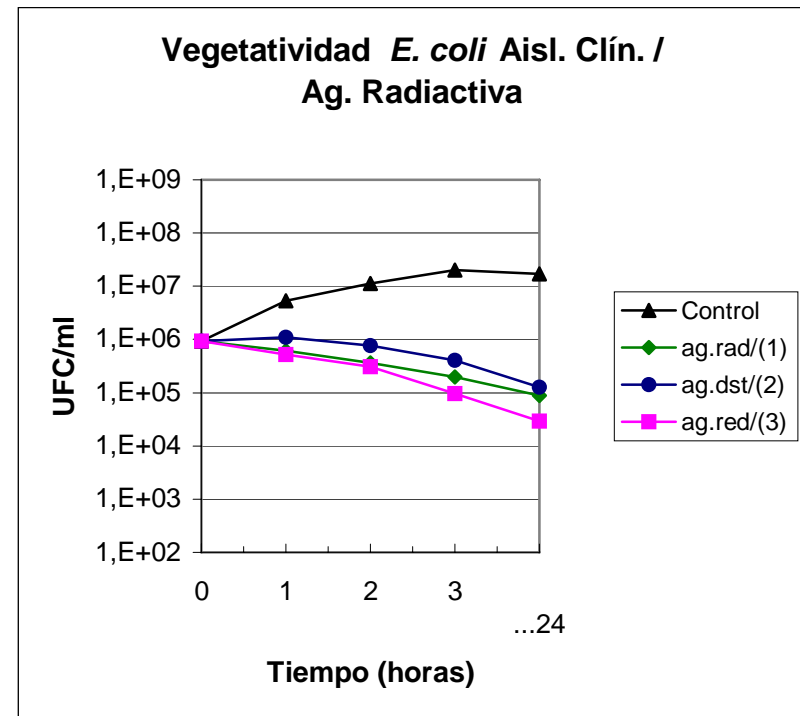
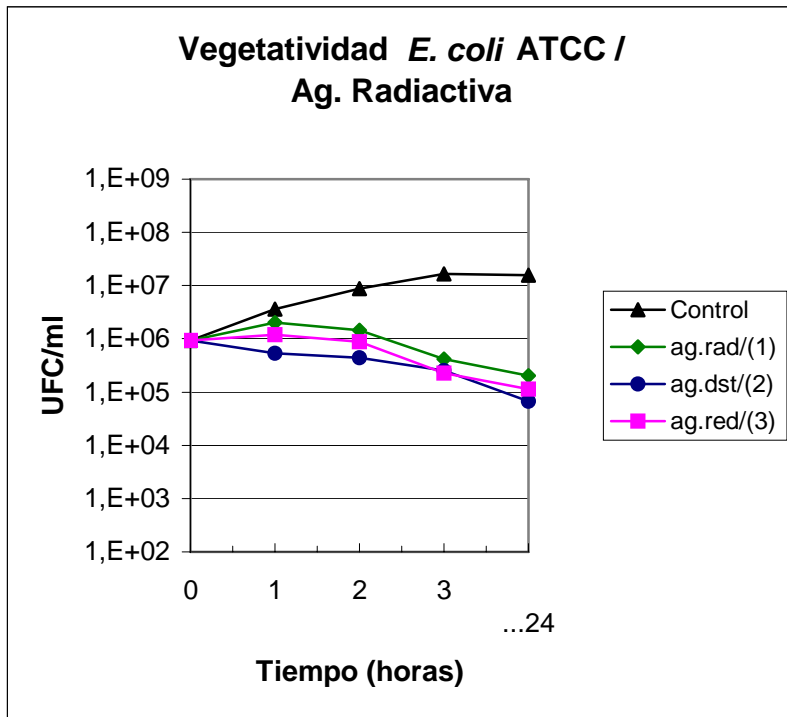
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 6,31 | 5,73 | 6,08 |
| 2 | 6,94 | 6,16 | 5,65 | 5,94 |
| 3 | 7,22 | 5,62 | 5,41 | 5,36 |
| ...24 | 7,19 | 5,31 | 4,83 | 5,06 |
| RII | -1,25 | 0,66 | 1,14 | 0,91 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 5,79 | 6,04 | 5,72 |
| 2 | 7,06 | 5,56 | 5,88 | 5,49 |
| 3 | 7,31 | 5,29 | 5,61 | 4,98 |
| ...24 | 7,23 | 4,95 | 5,10 | 4,47 |
| RII | -1,26 | 1,02 | 0,86 | 1,50 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 2,04E+06 | 5,42E+05 | 1,21E+06 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,45E+06 | 4,43E+05 | 8,75E+05 |
| 3 | 1,66E+07 | 4,15E+05 | 2,55E+05 | 2,30E+05 |
| ...24 | 1,55E+07 | 2,05E+05 | 6,75E+04 | 1,15E+05 |
| % Reducción: | -1566,67 | 77,96 | 92,74 | 87,67 |

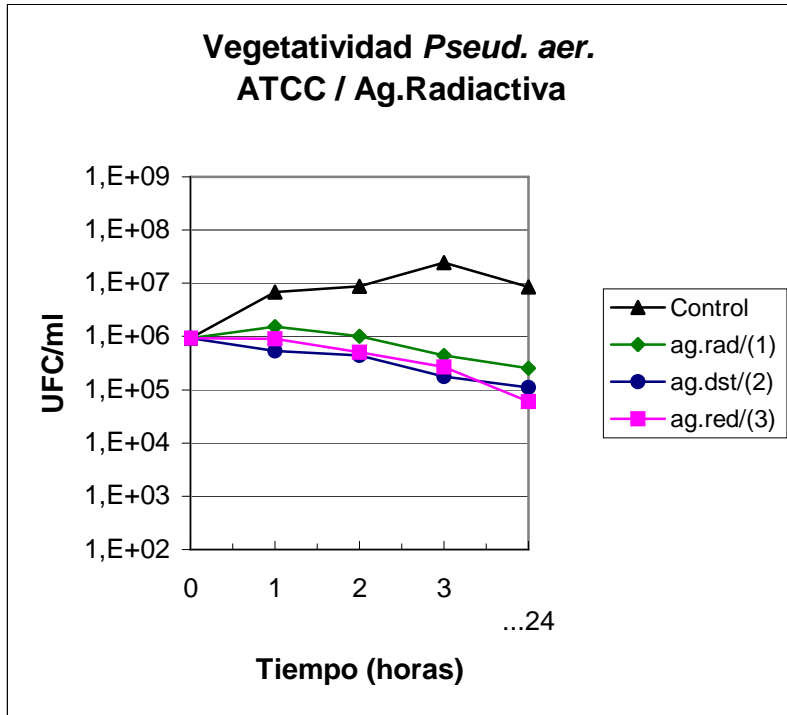
| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 6,20E+05 | 1,11E+06 | 5,25E+05 |
| 2 | 1,14E+07 | 3,63E+05 | 7,60E+05 | 3,09E+05 |
| 3 | 2,04E+07 | 1,95E+05 | 4,03E+05 | 9,50E+04 |
| ...24 | 1,71E+07 | 8,83E+04 | 1,27E+05 | 2,93E+04 |
| % Reducción: | -1738,71 | 90,50 | 86,31 | 96,85 |



Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbianas en expresión logarítmica

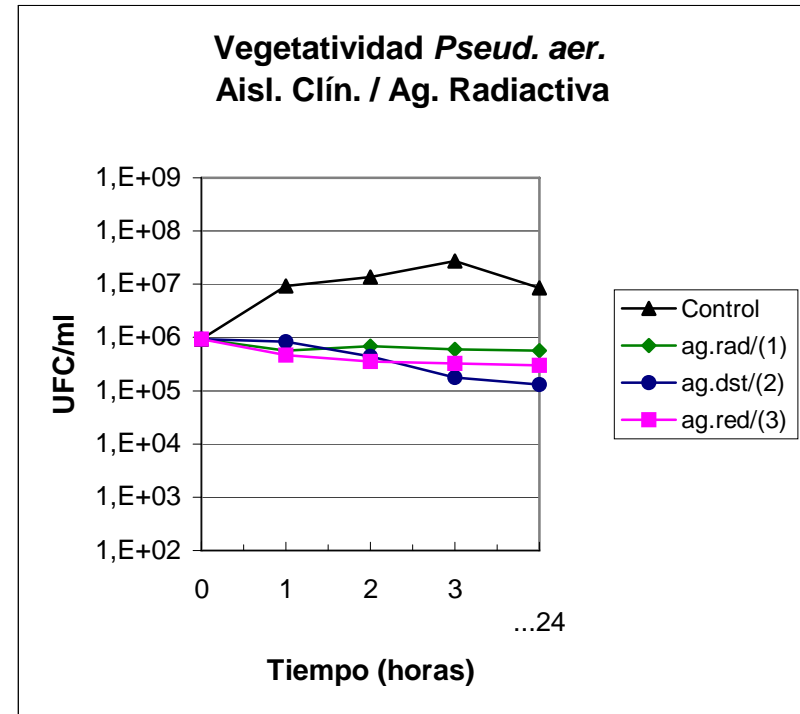
| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 6,19 | 5,73 | 5,96 |
| 2 | 6,94 | 6,00 | 5,65 | 5,70 |
| 3 | 7,39 | 5,65 | 5,24 | 5,43 |
| ...24 | 6,93 | 5,41 | 5,05 | 4,78 |
| RII | -0,96 | 0,56 | 0,92 | 1,19 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 1,55E+06 | 5,38E+05 | 9,05E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,00E+06 | 4,43E+05 | 5,00E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 4,45E+05 | 1,75E+05 | 2,71E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 2,56E+05 | 1,12E+05 | 6,00E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 72,46 | 87,99 | 93,55 |



| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 5,75 | 5,93 | 5,67 |
| 2 | 7,14 | 5,83 | 5,65 | 5,54 |
| 3 | 7,43 | 5,78 | 5,24 | 5,51 |
| ...24 | 6,93 | 5,75 | 5,11 | 5,47 |
| RII | -0,96 | 0,22 | 0,86 | 0,50 |

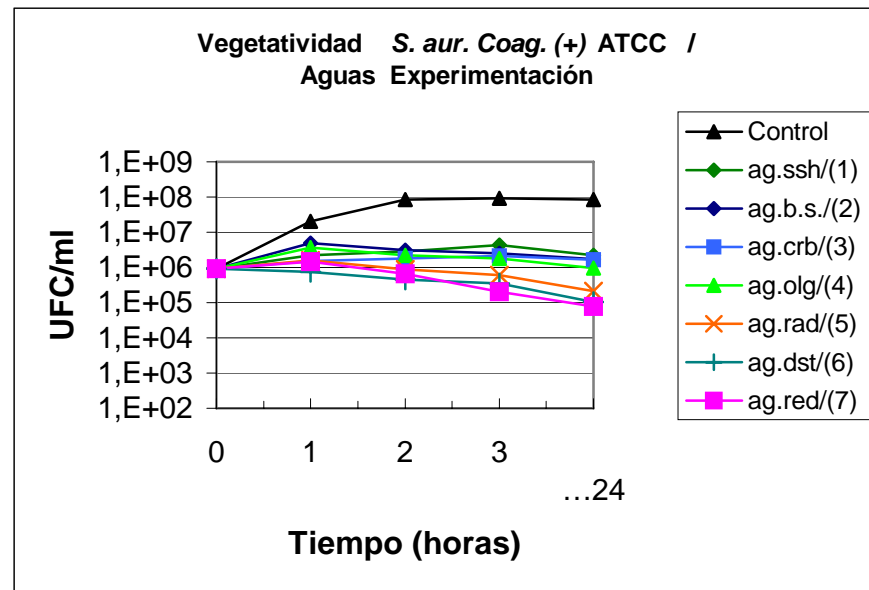
| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 5,65E+05 | 8,45E+05 | 4,63E+05 |
| 2 | 1,38E+07 | 6,83E+05 | 4,43E+05 | 3,50E+05 |
| 3 | 2,70E+07 | 6,05E+05 | 1,75E+05 | 3,25E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 5,65E+05 | 1,29E+05 | 2,97E+05 |
| % Reducción: | -813,98 | 39,25 | 86,09 | 68,10 |

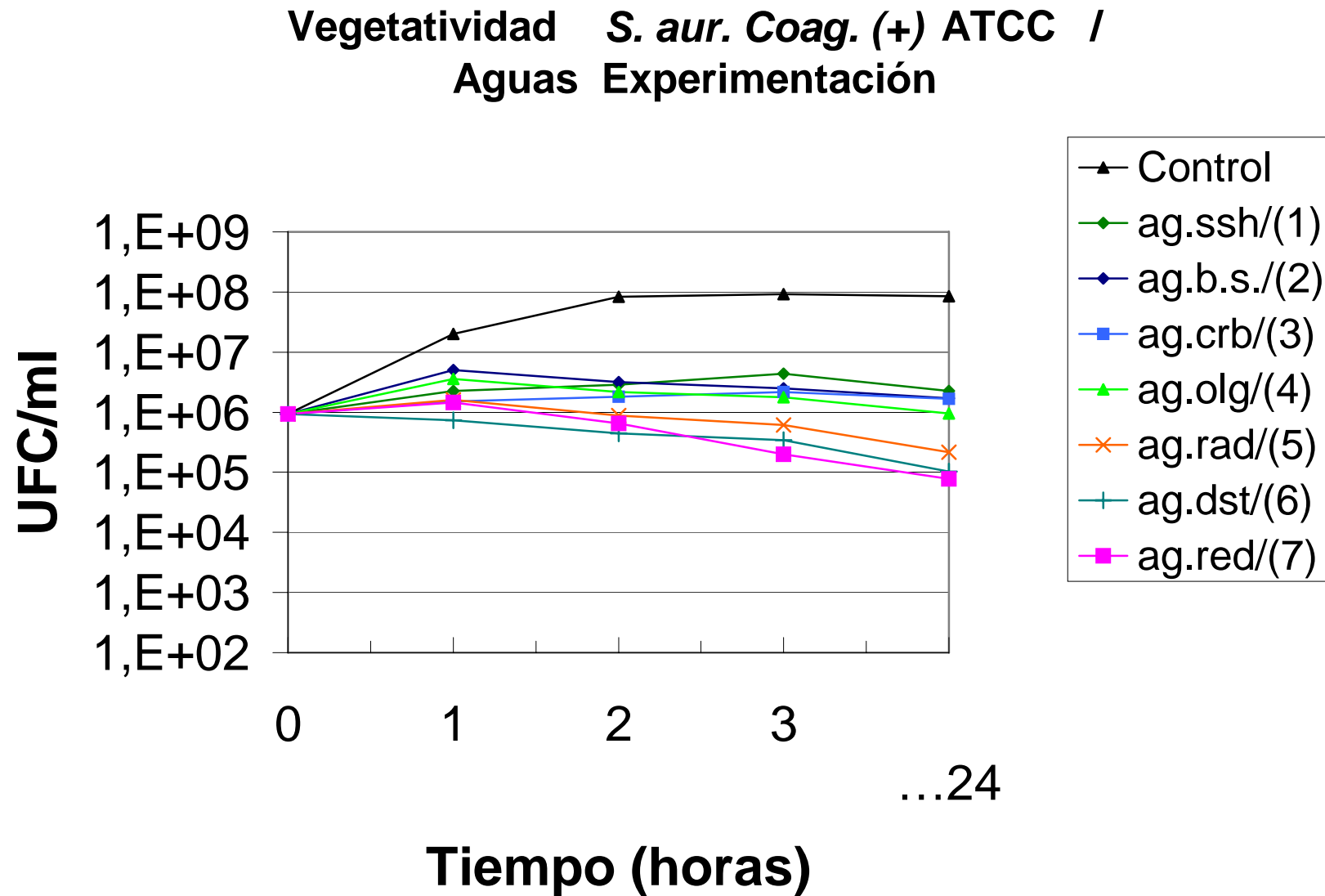


Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,30 | 6,35 | 6,70 | 6,18 | 6,56 | 6,21 | 5,87 | 6,16 |
| 2 | 7,92 | 6,46 | 6,50 | 6,26 | 6,34 | 5,94 | 5,65 | 5,82 |
| 3 | 7,97 | 6,64 | 6,40 | 6,33 | 6,25 | 5,78 | 5,54 | 5,30 |
| ...24 | 7,93 | 6,35 | 6,23 | 6,22 | 5,98 | 5,33 | 5,01 | 4,89 |
| RII | -1,96 | -0,38 | -0,26 | -0,26 | -0,01 | 0,64 | 0,96 | 1,07 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,00E+07 | 2,24E+06 | 5,00E+06 | 1,53E+06 | 3,60E+06 | 1,61E+06 | 7,37E+05 | 1,45E+06 |
| 2 | 8,38E+07 | 2,87E+06 | 3,15E+06 | 1,80E+06 | 2,18E+06 | 8,78E+05 | 4,43E+05 | 6,56E+05 |
| 3 | 9,25E+07 | 4,40E+06 | 2,51E+06 | 2,15E+06 | 1,77E+06 | 6,07E+05 | 3,45E+05 | 2,00E+05 |
| ...24 | 8,45E+07 | 2,25E+06 | 1,70E+06 | 1,68E+06 | 9,58E+05 | 2,15E+05 | 1,03E+05 | 7,83E+04 |
| % Reducción: | -8986,02 | -141,94 | -83,15 | -80,11 | -3,05 | 76,92 | 88,92 | 91,59 |

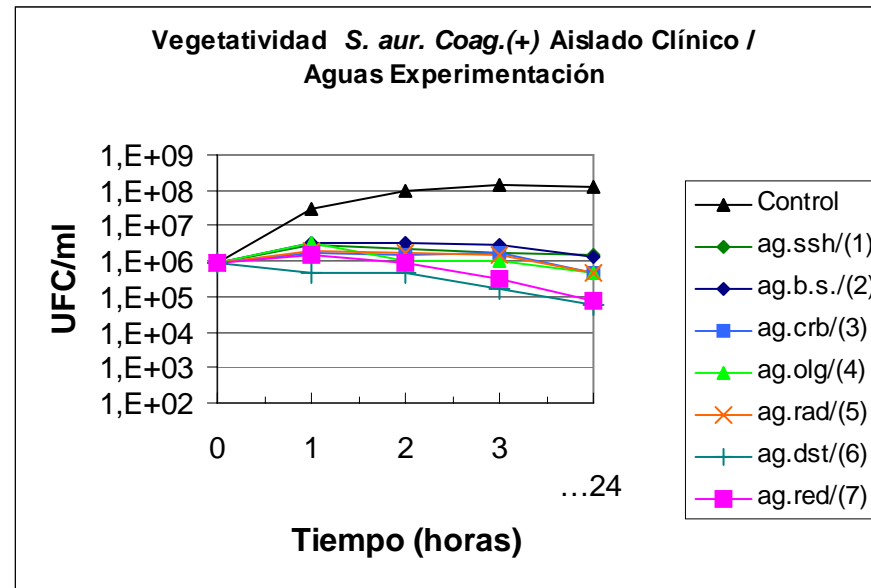




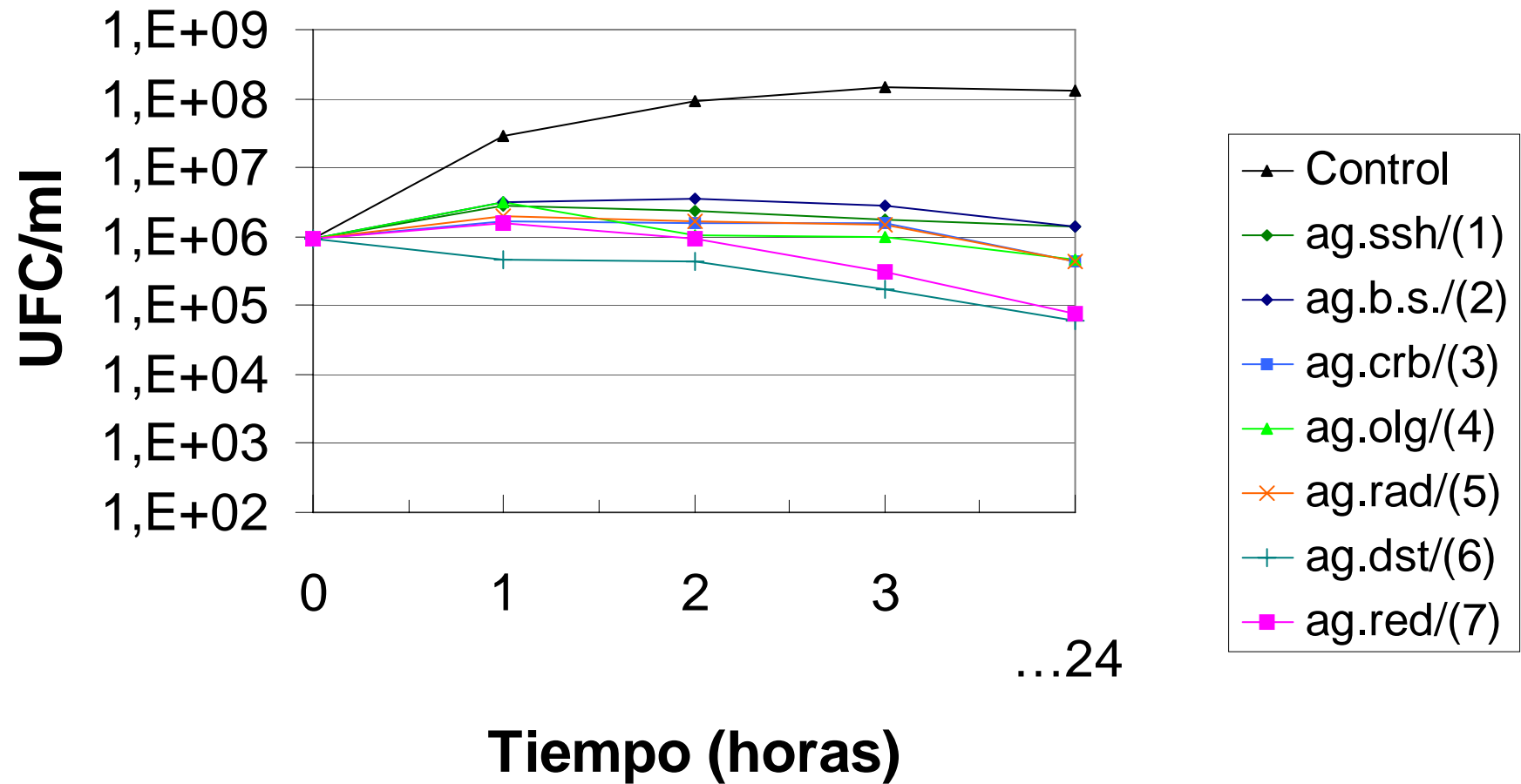
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 7,45 | 6,44 | 6,50 | 6,22 | 6,50 | 6,29 | 5,67 | 6,18 |
| 2 | 7,97 | 6,37 | 6,54 | 6,18 | 6,03 | 6,21 | 5,65 | 5,97 |
| 3 | 8,16 | 6,25 | 6,45 | 6,21 | 5,99 | 6,16 | 5,24 | 5,49 |
| ...24 | 8,11 | 6,15 | 6,13 | 5,65 | 5,65 | 5,65 | 4,78 | 4,88 |
| RII | -2,14 | -0,19 | -0,16 | 0,32 | 0,31 | 0,32 | 1,19 | 1,09 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|-----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 2,83E+07 | 2,73E+06 | 3,18E+06 | 1,65E+06 | 3,18E+06 | 1,95E+06 | 4,73E+05 | 1,53E+06 |
| 2 | 9,25E+07 | 2,35E+06 | 3,50E+06 | 1,53E+06 | 1,06E+06 | 1,64E+06 | 4,43E+05 | 9,29E+05 |
| 3 | 1,44E+08 | 1,77E+06 | 2,85E+06 | 1,61E+06 | 9,68E+05 | 1,44E+06 | 1,75E+05 | 3,08E+05 |
| ...24 | 1,28E+08 | 1,43E+06 | 1,36E+06 | 4,46E+05 | 4,51E+05 | 4,46E+05 | 6,00E+04 | 7,50E+04 |
| % Reducción: | -13609,68 | -53,23 | -46,06 | 52,08 | 51,47 | 52,08 | 93,55 | 91,94 |



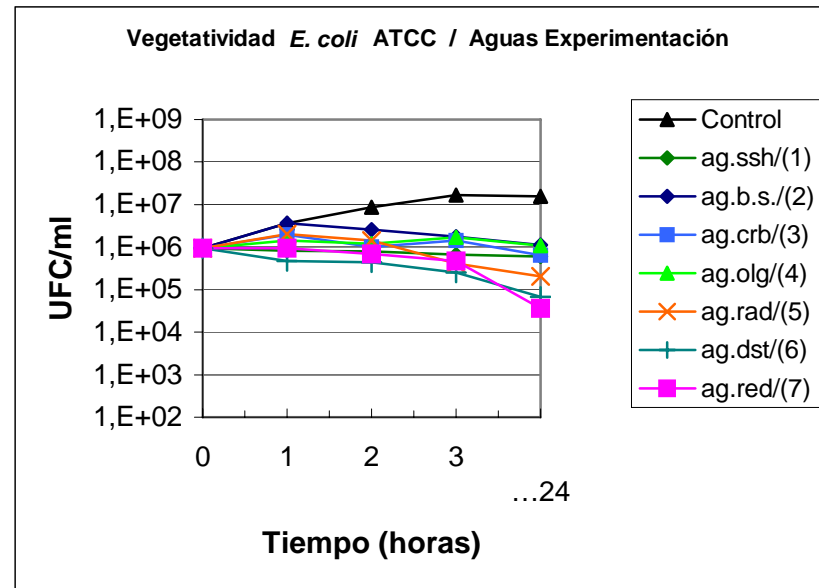
Vegetatividad *S. aur. Coag.(+)* Aislado Clínico / Aguas Experimentación



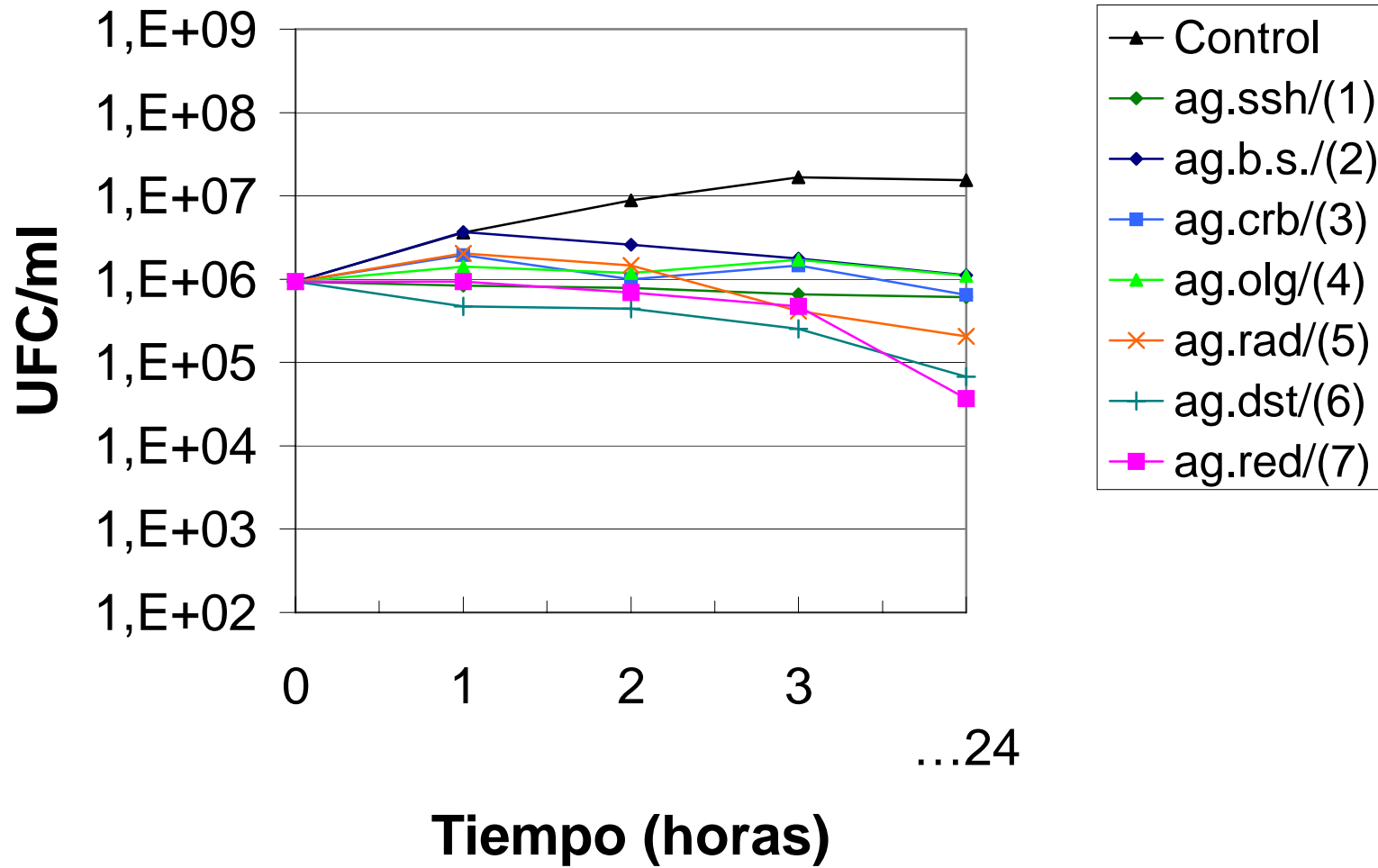
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,56 | 5,92 | 6,57 | 6,29 | 6,15 | 6,31 | 5,67 | 5,97 |
| 2 | 6,94 | 5,90 | 6,42 | 6,00 | 6,08 | 6,16 | 5,65 | 5,84 |
| 3 | 7,22 | 5,82 | 6,24 | 6,16 | 6,23 | 5,62 | 5,41 | 5,67 |
| ...24 | 7,19 | 5,78 | 6,05 | 5,81 | 6,04 | 5,31 | 4,83 | 4,56 |
| RII | -1,22 | 0,19 | -0,08 | 0,16 | -0,07 | 0,66 | 1,14 | 1,40 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 3,63E+06 | 8,30E+05 | 3,68E+06 | 1,95E+06 | 1,41E+06 | 2,04E+06 | 4,73E+05 | 9,40E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 7,88E+05 | 2,60E+06 | 1,00E+06 | 1,20E+06 | 1,45E+06 | 4,43E+05 | 6,93E+05 |
| 3 | 1,66E+07 | 6,62E+05 | 1,75E+06 | 1,45E+06 | 1,71E+06 | 4,15E+05 | 2,55E+05 | 4,72E+05 |
| ...24 | 1,55E+07 | 6,07E+05 | 1,12E+06 | 6,50E+05 | 1,09E+06 | 2,05E+05 | 6,75E+04 | 3,67E+04 |
| % Reducción: | -1566,67 | 34,71 | -20,50 | 30,11 | -16,94 | 77,96 | 92,74 | 96,06 |



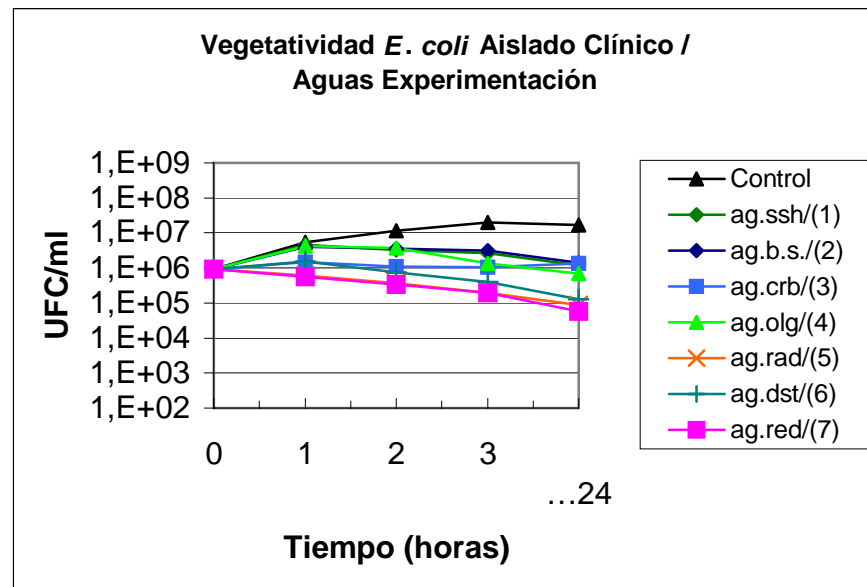
Vegetatividad *E. coli* ATCC / Aguas Experimentación



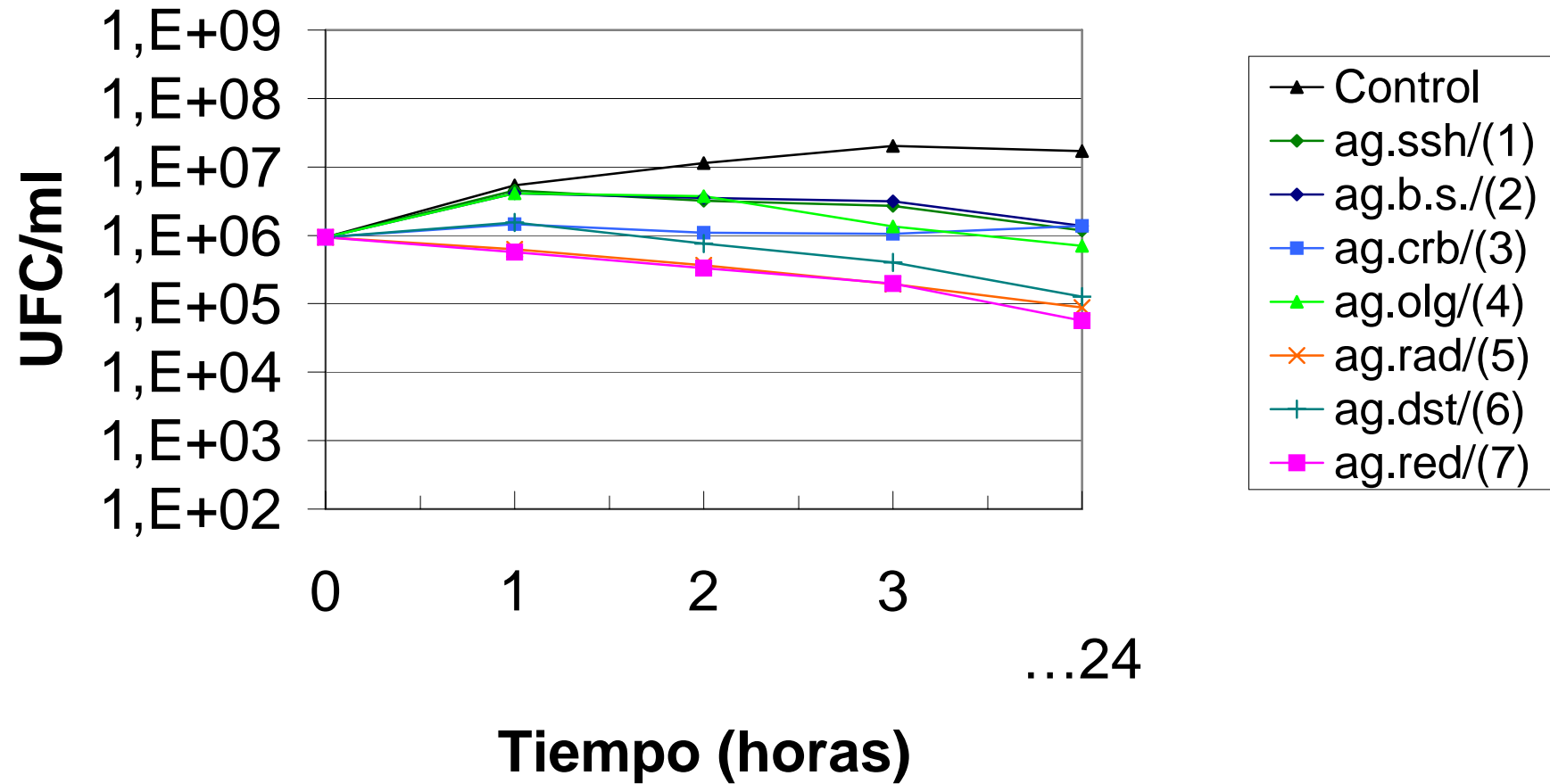
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,73 | 6,66 | 6,61 | 6,16 | 6,62 | 5,79 | 6,19 | 5,75 |
| 2 | 7,06 | 6,51 | 6,55 | 6,04 | 6,57 | 5,56 | 5,88 | 5,52 |
| 3 | 7,31 | 6,43 | 6,49 | 6,02 | 6,13 | 5,29 | 5,61 | 5,30 |
| ...24 | 7,23 | 6,07 | 6,14 | 6,13 | 5,85 | 4,95 | 5,10 | 4,76 |
| RII | -1,26 | -0,10 | -0,17 | -0,17 | 0,12 | 1,02 | 0,86 | 1,21 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 5,38E+06 | 4,56E+06 | 4,08E+06 | 1,45E+06 | 4,13E+06 | 6,20E+05 | 1,55E+06 | 5,64E+05 |
| 2 | 1,14E+07 | 3,21E+06 | 3,55E+06 | 1,10E+06 | 3,75E+06 | 3,63E+05 | 7,60E+05 | 3,31E+05 |
| 3 | 2,04E+07 | 2,68E+06 | 3,13E+06 | 1,05E+06 | 1,34E+06 | 1,95E+05 | 4,03E+05 | 1,98E+05 |
| ...24 | 1,71E+07 | 1,18E+06 | 1,39E+06 | 1,36E+06 | 7,00E+05 | 8,83E+04 | 1,27E+05 | 5,70E+04 |
| % Reducción: | -1738,71 | -27,24 | -48,92 | -46,51 | 24,73 | 90,50 | 86,31 | 93,87 |



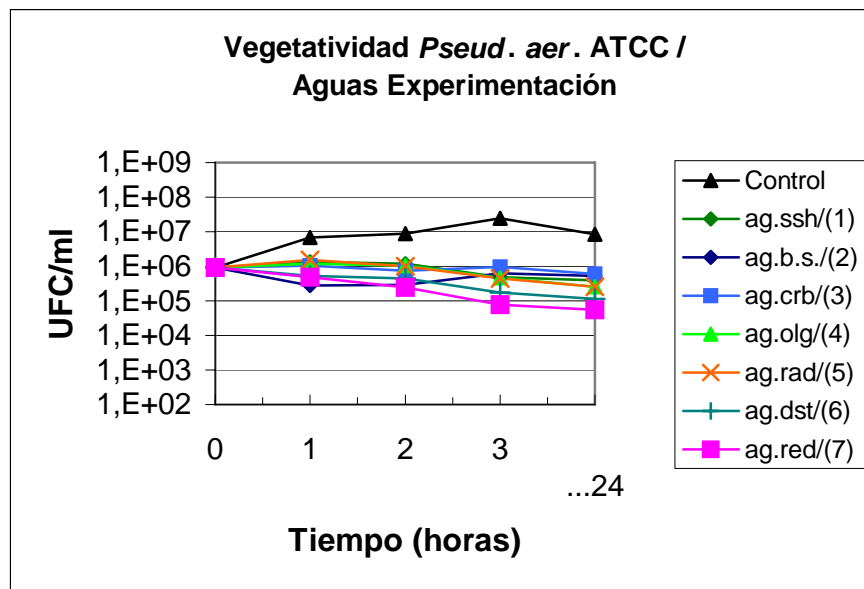
Vegetatividad *E. coli* Aislado Clínico / Aguas Experimentación



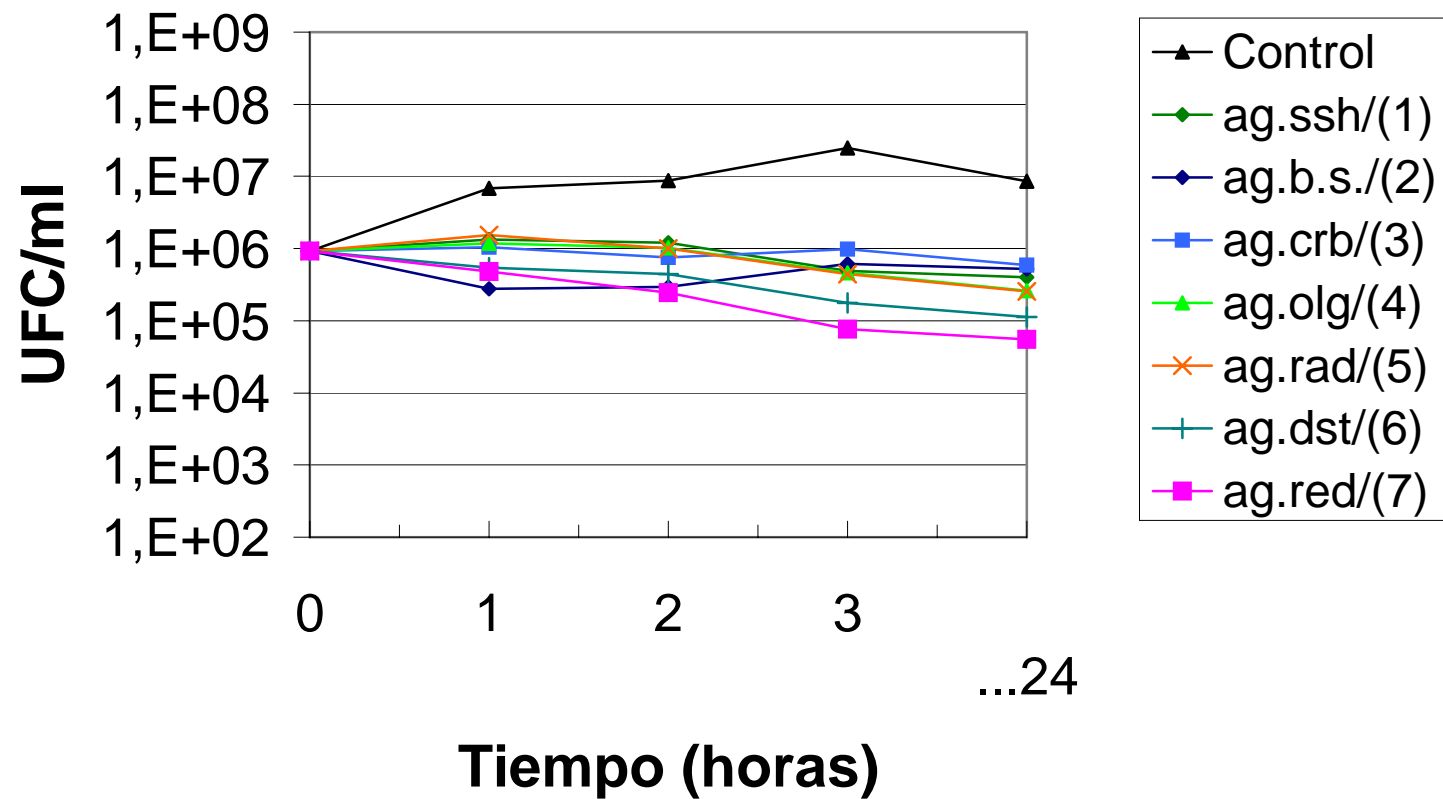
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,84 | 6,13 | 5,45 | 6,02 | 6,07 | 6,19 | 5,73 | 5,68 |
| 2 | 6,94 | 6,08 | 5,47 | 5,88 | 6,01 | 6,00 | 5,65 | 5,39 |
| 3 | 7,39 | 5,69 | 5,79 | 5,99 | 5,66 | 5,65 | 5,24 | 4,88 |
| ...24 | 6,93 | 5,60 | 5,72 | 5,77 | 5,41 | 5,41 | 5,05 | 4,74 |
| RII | -0,96 | 0,37 | 0,25 | 0,20 | 0,56 | 0,56 | 0,92 | 1,23 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 6,90E+06 | 1,34E+06 | 2,79E+05 | 1,05E+06 | 1,18E+06 | 1,55E+06 | 5,38E+05 | 4,83E+05 |
| 2 | 8,80E+06 | 1,20E+06 | 2,96E+05 | 7,50E+05 | 1,03E+06 | 1,00E+06 | 4,43E+05 | 2,46E+05 |
| 3 | 2,48E+07 | 4,87E+05 | 6,20E+05 | 9,75E+05 | 4,59E+05 | 4,45E+05 | 1,75E+05 | 7,67E+04 |
| ...24 | 8,50E+06 | 3,98E+05 | 5,21E+05 | 5,88E+05 | 2,58E+05 | 2,56E+05 | 1,12E+05 | 5,53E+04 |
| % Reducción: | -813,98 | 57,22 | 43,94 | 36,83 | 72,22 | 72,46 | 87,99 | 94,06 |



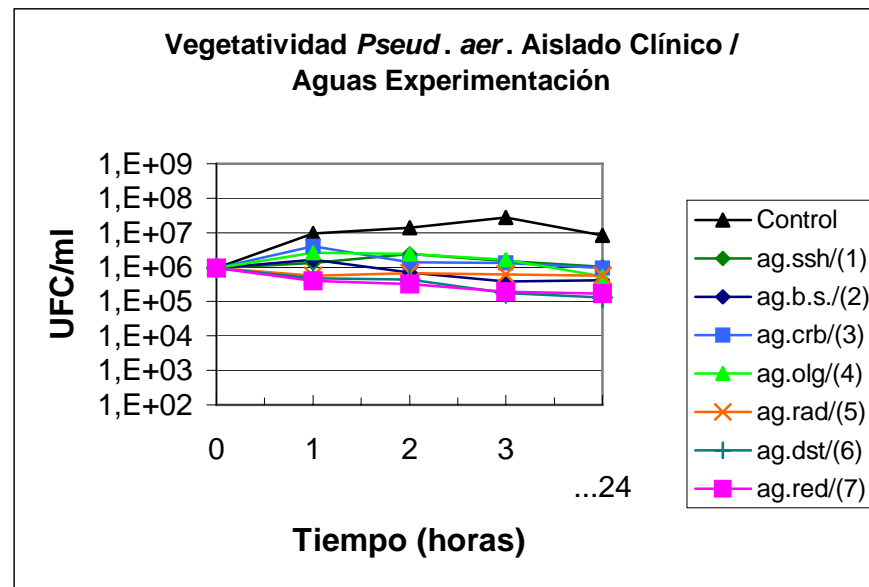
Vegetatividad *Pseud. aer.* ATCC / Aguas Experimentación



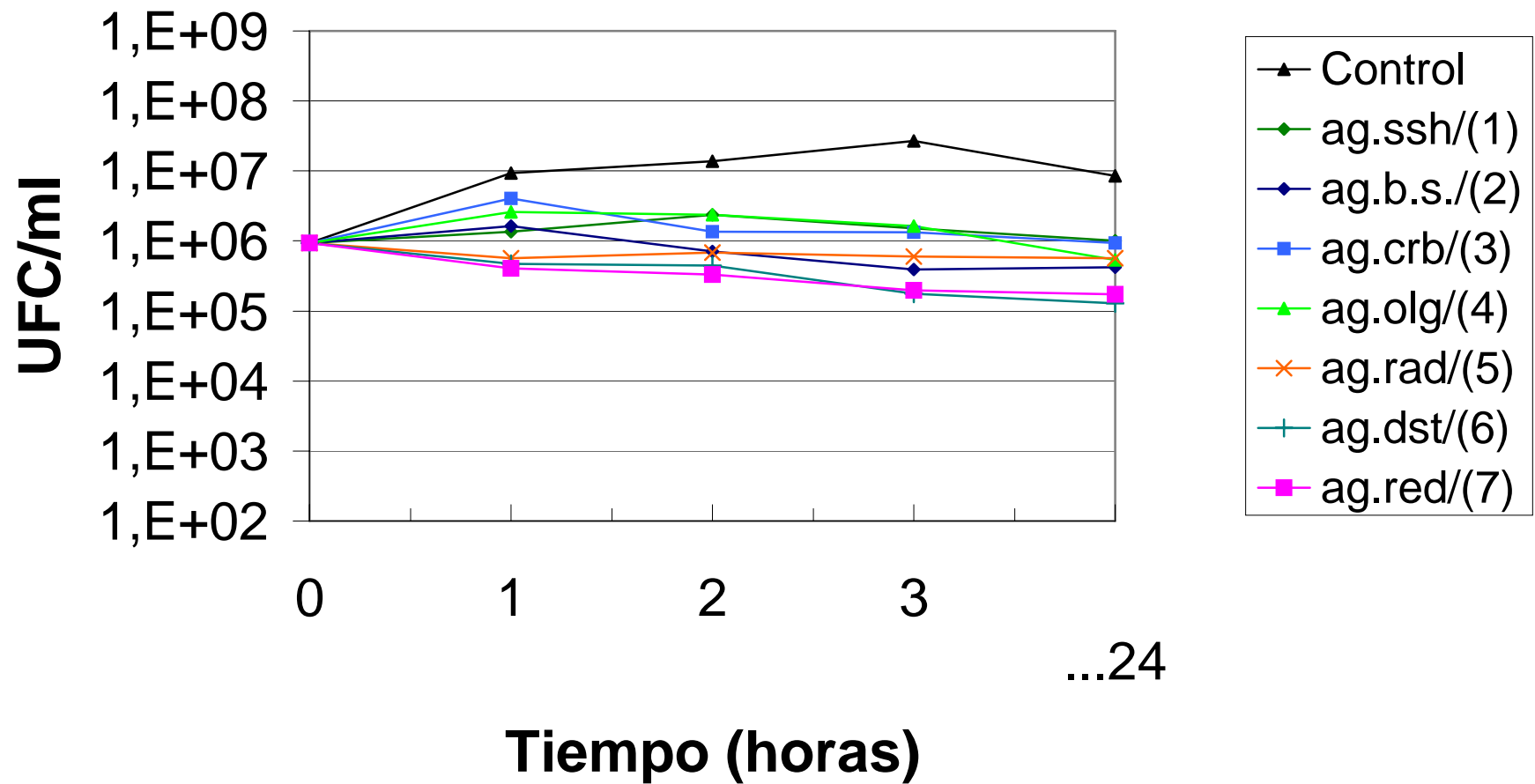
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 1 | 6,97 | 6,13 | 6,21 | 6,61 | 6,41 | 5,75 | 5,67 | 5,61 |
| 2 | 7,14 | 6,38 | 5,85 | 6,13 | 6,37 | 5,83 | 5,65 | 5,52 |
| 3 | 7,43 | 6,18 | 5,59 | 6,12 | 6,21 | 5,78 | 5,24 | 5,29 |
| ...24 | 6,93 | 6,00 | 5,62 | 5,97 | 5,73 | 5,75 | 5,11 | 5,23 |
| RII | -0,96 | -0,03 | 0,35 | -0,01 | 0,24 | 0,22 | 0,86 | 0,73 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 1 | 9,34E+06 | 1,35E+06 | 1,62E+06 | 4,03E+06 | 2,58E+06 | 5,65E+05 | 4,73E+05 | 4,03E+05 |
| 2 | 1,38E+07 | 2,38E+06 | 7,07E+05 | 1,36E+06 | 2,36E+06 | 6,83E+05 | 4,43E+05 | 3,28E+05 |
| 3 | 2,70E+07 | 1,51E+06 | 3,88E+05 | 1,32E+06 | 1,63E+06 | 6,05E+05 | 1,75E+05 | 1,97E+05 |
| ...24 | 8,50E+06 | 1,00E+06 | 4,18E+05 | 9,42E+05 | 5,36E+05 | 5,65E+05 | 1,29E+05 | 1,72E+05 |
| % Reducción: | -813,98 | -7,89 | 55,02 | -1,25 | 42,42 | 39,25 | 86,09 | 81,54 |



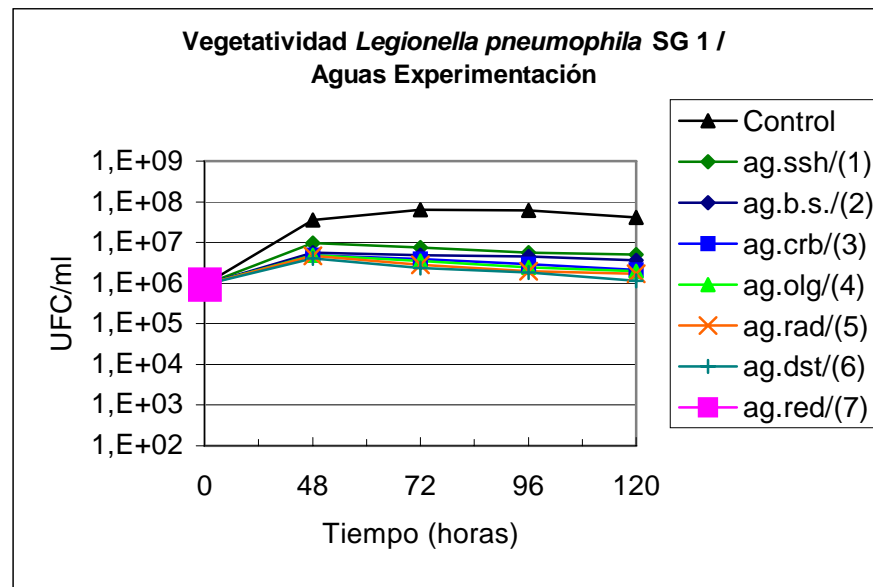
Vegetatividad *Pseud. aer.* Aislado Clínico / Aguas Experimentación



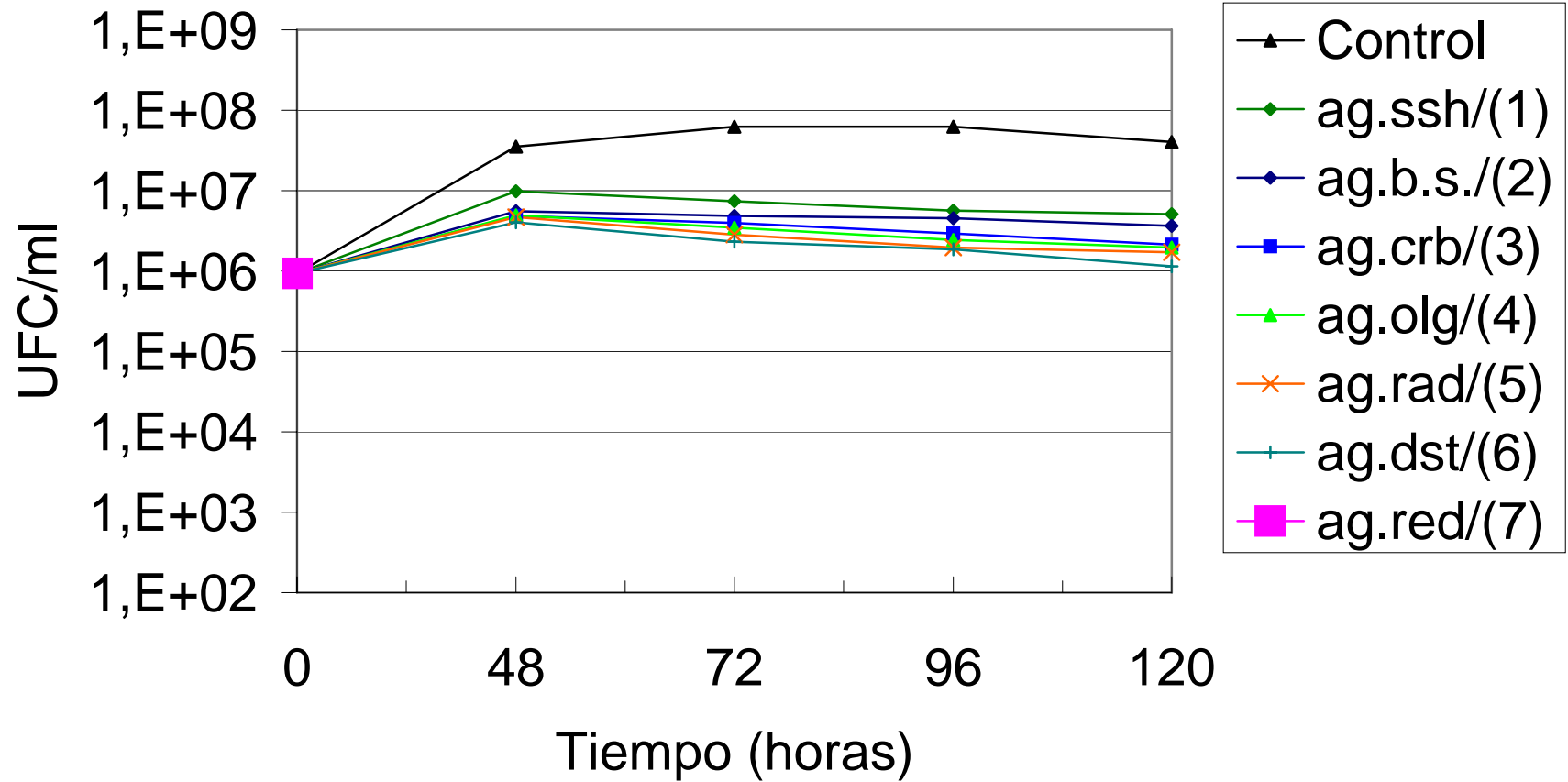
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logaritmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,99 | 6,75 | 6,69 | 6,69 | 6,67 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,87 | 6,69 | 6,60 | 6,54 | 6,45 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,75 | 6,66 | 6,46 | 6,38 | 6,29 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,71 | 6,56 | 6,33 | 6,29 | 6,23 | 6,06 | |
| RII | -1,64 | -0,74 | -0,60 | -0,36 | -0,32 | -0,26 | -0,09 | 5,97 |

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.b.s./(2) | ag.crb/(3) | ag.olg/(4) | ag.rad/(5) | ag.dst/(6) | ag.red/(7) |
|--------------|----------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 9,85E+06 | 5,56E+06 | 4,85E+06 | 4,91E+06 | 4,66E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 7,40E+06 | 4,88E+06 | 3,96E+06 | 3,47E+06 | 2,83E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 5,60E+06 | 4,58E+06 | 2,91E+06 | 2,42E+06 | 1,95E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 5,13E+06 | 3,67E+06 | 2,12E+06 | 1,95E+06 | 1,70E+06 | 1,15E+06 | |
| % Reducción: | -4260,22 | -451,61 | -294,09 | -127,69 | -109,41 | -83,06 | -23,12 | |



Vegetatividad *Legionella pneumophila* SG 1 / Aguas Experimentación



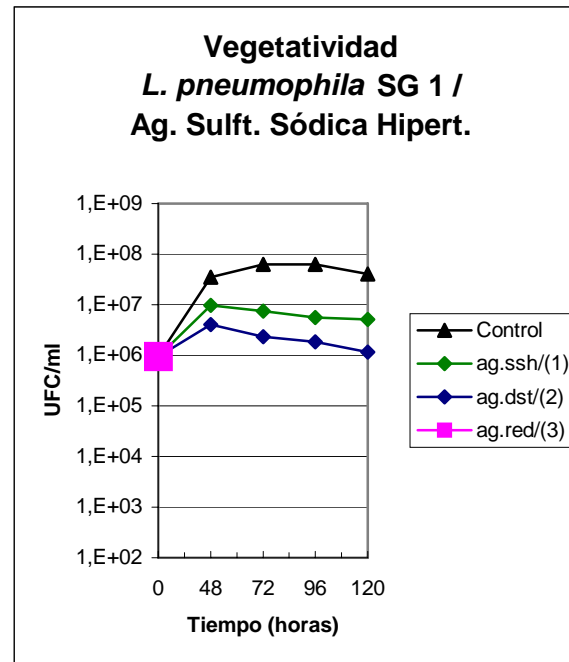
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,99 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,87 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,75 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,71 | 6,06 | |

RII -1,64 -0,74 -0,09

| Tiempo | Control | ag.ssh/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 9,85E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 7,40E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 5,60E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 5,13E+06 | 1,15E+06 | |

% Reducción: -4260,22 -451,61 -23,12



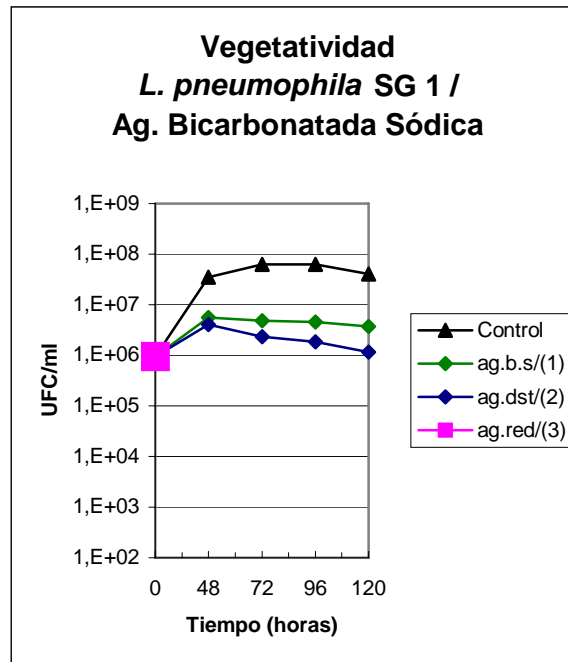
Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.b.s/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,75 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,69 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,66 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,56 | 6,06 | |

RII -1,64 -0,60 -0,09

| Tiempo | Control | ag.b.s/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 5,56E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 4,88E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 4,58E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 3,67E+06 | 1,15E+06 | |

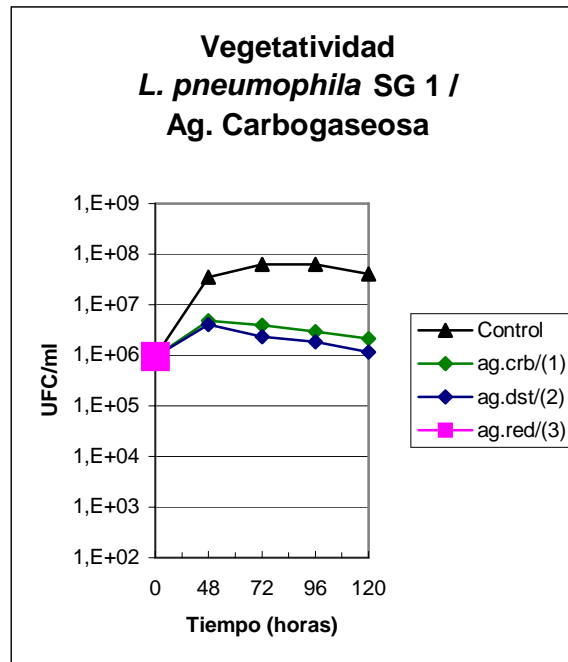
% Reducción: -4260,22 -294,09 -23,12



Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,69 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,60 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,46 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,33 | 6,06 | |
| RII | -1,64 | -0,36 | -0,09 | 5,97 |

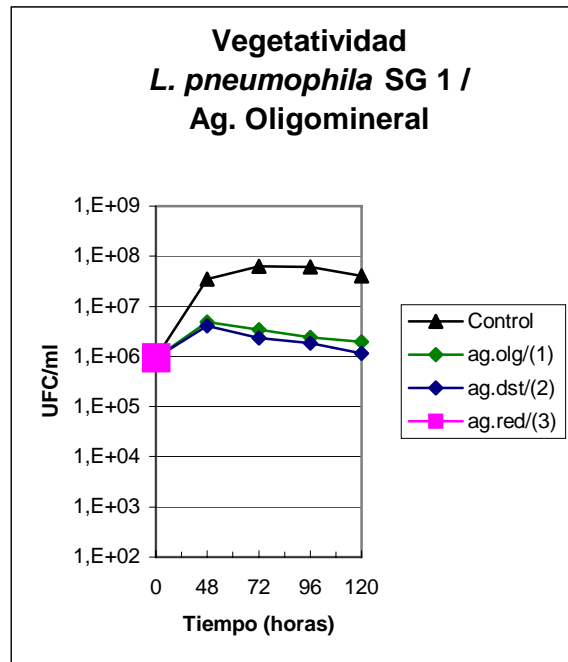
| Tiempo | Control | ag.crb/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 4,85E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 3,96E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 2,91E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 2,12E+06 | 1,15E+06 | |
| % Reducción: | -4260,22 | -127,69 | -23,12 | |



Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,69 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,54 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,38 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,29 | 6,06 | |
| RII | -1,64 | -0,32 | -0,09 | 5,97 |

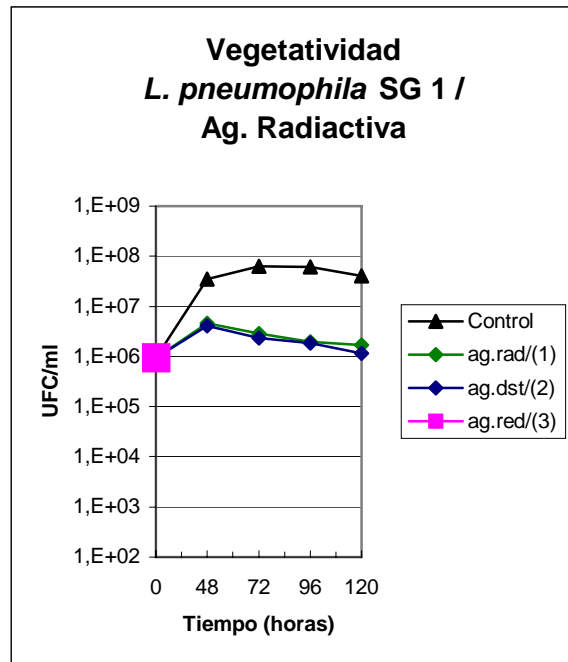
| Tiempo | Control | ag.olg/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 4,91E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 3,47E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 2,42E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 1,95E+06 | 1,15E+06 | |
| % Reducción: | -4260,22 | -109,41 | -23,12 | |



Curvas promedio de crecimiento y letalidad microbiana en expresión logarítmica

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------|---------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,97 | 5,97 | 5,97 | 5,97 |
| 48 | 7,55 | 6,67 | 6,61 | |
| 72 | 7,80 | 6,45 | 6,37 | |
| 96 | 7,79 | 6,29 | 6,27 | |
| 120 | 7,61 | 6,23 | 6,06 | |
| RII | -1,64 | -0,26 | -0,09 | 5,97 |

| Tiempo | Control | ag.rad/(1) | ag.dst/(2) | ag.red/(3) |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| 0 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 | 9,30E+05 |
| 48 | 3,53E+07 | 4,66E+06 | 4,05E+06 | |
| 72 | 6,28E+07 | 2,83E+06 | 2,33E+06 | |
| 96 | 6,20E+07 | 1,95E+06 | 1,85E+06 | |
| 120 | 4,06E+07 | 1,70E+06 | 1,15E+06 | |
| % Reducción: | -4260,22 | -83,06 | -23,12 | |



**BLOQUE DE TABLAS -III-
(nº total de tablas 10)**

**VEGETATIVIDAD DE LOS GÉRMENES DEL ESTUDIO EN LAS AGUAS
MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL SEGÚN TIEMPO DE EXPOSICIÓN.
SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA**

Vegetatividad en agua Sulf. Sód. Hipert. y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | | | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | | | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | | | ANOVA p-Valor | 24 HORAS | | |
|--|------------------|---------|-------|-------|------------------|---------|-------|-------|------------------|---------|-------|-------|------------------|----------|-------|-------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A | 7.300 | mnut | <.0001 | A | 7.920 | mnut | <.0001 | A | 7.970 | mnut | <.0001 | A | 7.930 | mnut |
| | | B | 6.350 | agssh | | B | 6.460 | agssh | | B | 6.720 | adssh | | B | 6.350 | agssh |
| | | B C | 6.160 | ared | | C | 5.980 | ared | | C | 5.540 | adest | | C | 5.010 | adest |
| | | C | 5.870 | adest | | C | 5.650 | adest | | C | 5.300 | ared | | C | 4.890 | ared |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A | 7.450 | mnut | <.0001 | A | 7.970 | mnut | <.0001 | A | 8.160 | mnut | <.0001 | A | 8.110 | mnut |
| | | B | 6.440 | agssh | | B | 6.440 | agssh | | B | 6.250 | agssh | | B | 6.150 | agssh |
| | | B | 6.180 | ared | | C | 5.970 | ared | | C | 5.290 | ared | | C | 4.880 | ared |
| | | C | 5.790 | adest | | C | 5.650 | adest | | C | 5.240 | adest | | C | 4.780 | adest |
| <i>E. coli</i> ATCC | <.0001 | A | 6.560 | mnut | <.0001 | A | 6.940 | mnut | <.0001 | A | 7.220 | mnut | <.0001 | A | 7.190 | mnut |
| | | B | 5.920 | agssh | | B | 5.900 | agssh | | B | 5.820 | agssh | | B | 5.780 | agssh |
| | | B | 5.730 | adest | | B C | 5.650 | adest | | C | 5.410 | adest | | C | 4.830 | adest |
| | | B | 5.610 | ared | | C | 5.400 | ared | | C | 5.110 | ared | | C | 4.620 | ared |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.730 | mnut | <.0001 | A | 7.060 | mnut | <.0001 | A | 7.310 | mnut | <.0001 | A | 7.230 | mnut |
| | | A | 6.660 | agssh | | B | 6.470 | agssh | | B | 6.430 | agssh | | B | 6.070 | agssh |
| | | A | 6.642 | ared | | B | 6.310 | ared | | C | 6.018 | ared | | C | 5.100 | adest |
| | | B | 6.040 | adest | | C | 5.880 | adest | | D | 5.610 | adest | | C | 4.930 | ared |
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | <.0001 | A | 6.840 | mnut | <.0001 | A | 6.940 | mnut | <.0001 | A | 7.390 | mnut | <.0001 | A | 6.930 | mnut |
| | | B | 6.130 | agssh | | B | 6.080 | agssh | | B | 5.690 | agssh | | B | 5.600 | agssh |
| | | C | 5.730 | adest | | C | 5.650 | adest | | C | 5.240 | adest | | C | 5.050 | adest |
| | | C | 5.680 | ared | | C | 5.410 | ared | | C | 4.880 | ared | | D | 4.740 | ared |
| <i>Pseud. aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.970 | mnut | <.0001 | A | 7.140 | mnut | <.0001 | A | 7.430 | mnut | <.0001 | A | 6.930 | mnut |
| | | B | 6.130 | agssh | | B | 6.380 | agssh | | B | 6.180 | agssh | | B | 6.000 | agssh |
| | | B | 5.930 | adest | | C | 5.650 | adest | | C | 5.240 | adest | | C | 5.110 | adest |
| | | C | 5.670 | ared | | D | 5.260 | ared | | C | 5.010 | ared | | D | 4.510 | ared |

Vegetatividad en agua Bicarbonatada Sódica y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | | ANOVA p-Valor | 24 HORAS | |
|--|------------------|---------|-------------|------------------|---------|-------------|------------------|---------|-------------|------------------|----------|-------------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A | 7.300 mnut | <.0001 | A | 7.920 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 7.930 mnut |
| | | B | 6.700 agbic | | B | 6.500 agbic | | B | 6.400 agbic | | B | 6.230 agbic |
| | | B | 6.400 ared | | C | 6.060 ared | | C | 5.860 ared | | C | 5,190 ared |
| | | C | 5.870 adest | | D | 5.650 adest | | D | 5.540 adest | | C | 5,010 adest |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A | 7.450 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 8.160 mnut | <.0001 | A | 8.110 mnut |
| | | B | 6.500 agbic | | B | 6.540 agbic | | B | 6.450 agbic | | B | 6.130 agbic |
| | | B | 6.220 ared | | B | 6.180 ared | | B | 6.220 ared | | C | 5.540 ared |
| | | C | 5.790 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5,240 adest | | D | 4.780 adest |
| <i>E. coli</i> ATCC | 0.0003 | A | 6.570 agbic | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.220 mnut | <.0001 | A | 7.190 mnut |
| | | A | 6.560 mnut | | B | 6.420 agbic | | B | 6.240 agbic | | B | 6.050 agbic |
| | | A | 6.210 ared | | B | 6.280 ared | | B | 6.080 ared | | C | 5.430 ared |
| | | B | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.410 adest | | D | 4.830 adest |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | 0.0002 | A | 6.730 mnut | <.0001 | A | 7.060 mnut | <.0001 | A | 7.310 mnut | <.0001 | A | 7.230 mnut |
| | | A | 6.610 agbic | | B | 6.550 agbic | | B | 6.490 agbic | | B | 6.140 agbic |
| | | A | 6.580 ared | | B | 6310 ared | | C | 6.020 ared | | C | 5.710 ared |
| | | B | 6.040 adest | | C | 5.880 adest | | D | 5.610 adest | | D | 5.100 adest |
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | <.0001 | A | 6.840 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.390 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 5.730 adest | | B | 5.650 adest | | B | 5.790 agbic | | B | 5.720 agbic |
| | | C | 5.450 agbic | | B | 5.470 agbic | | C | 5.240 adest | | C | 5.050 adest |
| | | D | 5.130 ared | | C | 5.010 ared | | D | 4.710 ared | | D | 4.400 ared |
| <i>Pseud. aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.970 mnut | <.0001 | A | 7.140 mnut | <.0001 | A | 7.430 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.210 agbic | | B | 5.850 agbic | | B | 5.590 agbic | | B | 5.620 agbic |
| | | C | 5.930 adest | | B | 5.650 adest | | C | 5.240 adest | | C | 5.110 adest |
| | | D | 5.670 ared | | C | 5.260 ared | | D | 4.800 ared | | D | 4.640 ared |

Vegetatividad en agua Carbogaseosa y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | | ANOVA p-Valor | 24 HORAS | |
|--|------------------|---------|--------------|------------------|---------|--------------|------------------|---------|--------------|------------------|----------|--------------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A | 7.300 mnut | <.0001 | A | 7.920 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 7.930 mnut |
| | | B | 6.220 ared | | B | 6.260 agcarb | | B | 6.330 agcarb | | B | 6.220 agcarb |
| | | B | 6.190 agcarb | | B | 6.180 ared | | B | 6.220 ared | | C | 5.530 ared |
| | | C | 5.870 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.540 adest | | D | 5.010 adest |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A | 7.450 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 8.160 mnut | <.0001 | A | 8.110 mnut |
| | | B | 6.220 agcarb | | B | 6.180 agcarb | | B | 6.210 agcarb | | B | 5.650 agcarb |
| | | C | 5.860 ared | | C | 5.670 ared | | C | 5.540 ared | | C | 4.780 adest |
| | | C | 5.790 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.240 adest | | C | 4.770 ared |
| <i>E. coli</i> ATCC | <.0001 | A | 6.560 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.220 mnut | <.0001 | A | 7.190 mnut |
| | | A | 6.290 agcarb | | B | 6.000 agcarb | | B | 6.160 agcarb | | B | 5.810 agcarb |
| | | B | 5.970 ared | | B | 5.840 ared | | C | 5.410 adest | | C | 4.830 adest |
| | | B | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.290 ared | | C | 4.556 ared |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | 0.0003 | A | 6.730 mnut | <.0001 | A | 7.060 mnut | <.0001 | A | 7.310 mnut | <.0001 | A | 7.230 mnut |
| | | B | 6.220 ared | | B | 6.180 ared | | B | 6.020 agcarb | | B | 6.210 ared |
| | | B | 6.160 agcarb | | B | 6.040 agcarb | | B | 6.010 ared | | B | 6.130 agcarb |
| | | B | 6.040 adest | | B | 5.880 adest | | B | 5.610 adest | | C | 5.100 adest |
| <i>Pseud.</i> <i>aer.</i> ATCC | <.0001 | A | 6.840 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.390 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.020 agcarb | | B | 5.880 agcarb | | B | 5.990 agcarb | | B | 5.770 agcarb |
| | | B | | | B | 5.840 ared | | C | 5.290 ared | | C | 5.220 ared |
| | | C | B 5.970 ared | | B | 5.650 adest | | C | 5.230 adest | | C | 5.050 adest |
| | | C | 5.730 adest | | | | | | | | | |
| <i>Pseud.</i> <i>aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.970 mnut | <.0001 | A | 7.140 mnut | <.0001 | A | 7.430 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.610 agcarb | | B | 6.130 agcarb | | B | 6.120 agcarb | | B | 5.970 agcarb |
| | | C | 5.930 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.290 ared | | C | 5.300 ared |
| | | D | 5.610 ared | | C | 5.520 ared | | C | 5.240 adest | | C | 5.110 adest |

Vegetatividad en agua Oligomineral y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística.

| | ANOV A p-Valor | 1ª HORA | | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | | ANOVA p-Valor | 24 HORAS | |
|--|----------------------|---------|--------------|------------------|---------|--------------|------------------|---------|--------------|------------------|----------|--------------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A | 7.300 mnut | <.0001 | A | 7.920 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 7.930 mnut |
| | | B | 6.560 agolig | | B | 6.340 agolig | | B | 6.250 agolig | | B | 5.980 agolig |
| | | B | 6.370 ared | | B | 6.270 ared | | C | 6.140 ared | | C | 5.010 adest |
| | | C | 5.870 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.740 adest | | C | 4.910 ared |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A | 7.450 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 8.160 mnut | <.0001 | A | 8.110 mnut |
| | | B | 6.500 agolig | | B | 6.030 agolig | | B | 5.990 agolig | | B | 5.650 agolig |
| | | C | 5.840 ared | | C | 5.650 adest | | C | 5.290 ared | | C | 4.780 adest |
| | | C | 5.790 adest | | C | 5.520 ared | | C | 5.240 adest | | C | 4.780 ared |
| <i>E. coli</i> ATCC | <.0001 | A | 6.560 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.220 mnut | <.0001 | A | 7.190 mnut |
| | | B | 6.150 agolig | | B | 6.080 agolig | | B | 6.230 agolig | | B | 6.040 agolig |
| | | B | 6.050 ared | | C | 5.860 ared | | C | 5.810 ared | | C | 5.610 ared |
| | | C | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | D | 5.410 adest | | D | 4.830 adest |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.730 mnut | <.0001 | A | 7.060 mnut | <.0001 | A | 7.310 mnut | <.0001 | A | 7.230 mnut |
| | | A | 6.620 agolig | | B | 6.570 agolig | | B | 6.130 agolig | | B | 5.850 agolig |
| | | B | 6.040 adest | | C | 5.880 adest | | C | 5.610 adest | | C | 5.100 adest |
| | | C | 5.750 ared | | D | 5.290 ared | | D | 5.306 ared | | D | 4.760 ared |
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | <.0001 | A | 6.840 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.390 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.070 agolig | | B | 6.010 agolig | | B | 5.660 agolig | | B | 5.410 agolig |
| | | C | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.240 adest | | C | 5.050 adest |
| | | C | 5.530 ared | | D | 5.100 ared | | C | 5.040 ared | | C | 4.980 ared |
| <i>Pseud. aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.970 mnut | <.0001 | A | 7.140 mnut | <.0001 | A | 7.430 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.410 agolig | | B | 6.370 agolig | | B | 6.210 agolig | | B | 5.730 agolig |
| | | B | 6.360 ared | | B | 6.320 ared | | B | 6.000 ared | | C | 5.210 ared |
| | | C | 5.930 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.240 adest | | C | 5.110 adest |

Vegetatividad en agua Radiactiva y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | | ANOVA p-Valor | 24 HORAS | |
|--|------------------|---------|-------------|------------------|---------|-------------|------------------|---------|-------------|------------------|----------|-------------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A | 7.300 mnut | <.0001 | A | 7.920 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 7.930 mnut |
| | | B | 6.210 agrad | | B | 5.940 agrad | | B | 5.780 agrad | | B | 5.330 agrad |
| | | B | 5.900 ared | | B | 5.740 ared | | C | 5.540 adest | | C | 5.010 adest |
| | | B | 5.870 adest | | B | 5.650 adest | | C | 5.290 ared | | C | 4.630 ared |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A | 7.450 mnut | <.0001 | A | 7.970 mnut | <.0001 | A | 8.160 mnut | <.0001 | A | 8.110 mnut |
| | | B | 6.290 agrad | | B | 6.210 agrad | | B | 6.160 agrad | | B | 5.650 agrad |
| | | B | 6.140 ared | | B | 6.960 ared | | B | 5.840 ared | | B | 5.650 adest |
| | | C | 5.790 adest | | C | 5.650 adest | | C | 5.240 adest | | B | 5.520 ared |
| <i>E. coli</i> ATCC | <.0001 | A | 6.560 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.220 mnut | <.0001 | A | 7.190 mnut |
| | | B | 6.310 agrad | | B | 6.160 agrad | | B | 5.620 agrad | | B | 5.310 agrad |
| | | B | 6.080 ared | | B | 5.940 ared | | B | 5.410 adest | | C | 5.060 ared |
| | | C | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | B | 5.360 ared | | D | 4.830 adest |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.730 mnut | <.0001 | A | 7.060 mnut | <.0001 | A | 7.310 mnut | <.0001 | A | 7.230 mnut |
| | | B | 6.040 adest | | B | 5.880 adest | | B | 5.610 adest | | B | 5.100 adest |
| | | C | 5.790 agrad | | C | 5.560 agrad | | C | 5.290 agrad | | B | 4.950 agrad |
| | | C | 5.720 ared | | C | 5.490 ared | | C | 4.980 ared | | C | 4.470 ared |
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | <.0001 | A | 6.840 mnut | <.0001 | A | 6.940 mnut | <.0001 | A | 7.390 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 6.190 agrad | | B | 6.000 agrad | | B | 5.650 agrad | | B | 5.410 agrad |
| | | B | 5.960 ared | | B | 5.700 ared | | B | 5.430 ared | | C | 5.050 adest |
| | | B | 5.730 adest | | C | 5.650 adest | | B | 5.240 adest | | D | 4.780 ared |
| <i>Pseud. aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A | 6.970 mnut | <.0001 | A | 7.140 mnut | <.0001 | A | 7.430 mnut | <.0001 | A | 6.930 mnut |
| | | B | 5.930 adest | | B | 5.830 agrad | | B | 5.780 agrad | | B | 5.750 agrad |
| | | B | 5.750 agrad | | B | 5.650 adest | | B | 5.510 ared | | C | 5.470 ared |
| | | B | 5.670 ared | | B | 5.540 ared | | C | 5.440 adest | | D | 5.110 adest |

Vegetatividad en todas las aguas y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | ANOVA p-Valor | 24 HORAS |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| <i>Staf. aur.</i> Coag. (+) ATCC | <.0001 | A 7.300 mnut | <.0001 | A 7.920 mnut | <.0001 | A 7.970 mnut | <.0001 | A 7.930 mnut |
| | | B 6.700 agbic | | B 6.500 agbic | | B 6.640 agssh | | B 6.350 agssh |
| | | C B 6.560 agolig | | B 6.460 agssh | | B 6.400 agbic | | B 6.230 agbic |
| | | C B 6.350 agssh | | B 6.340 agolig | | B 6.330 agcarb | | B 6.220 agcarb |
| | | C D 6.198 agreed | | C B 6.260 agcarb | | B 6.250 agolig | | B 5.980 agolig |
| | | D 6.190 agcarb | | C B 6.002 agreed | | C 5.780 agrad | | C 5.330 agrad |
| | | D 6.021 agrad | | C 5.940 agrad | | C 5.762 agreed | | C 5.030 agreed |
| | | E 5.870 agdest | | D 5.596 agdest | | C 5.540 agdest | | C 5.010 agdest |
| <i>Staf. aur.</i> Coag (+) Aisl. Clín. | <.0001 | A 7.450 mnut | <.0001 | A 7.970 mnut | <.0001 | A 8.160 mnut | <.0001 | A 8.110 mnut |
| | | B 6.500 agbic | | B 6.540 agbic | | B 6.450 agbic | | B 6.150 agssh |
| | | B 6.500 agolig | | B 6.420 agssh | | B 6.250 agssh | | B 6.130 agbic |
| | | B 6.440 agssh | | C B 6.210 agrad | | C B 6.210 agcarb | | B 5.650 agcarb |
| | | C B 6.290 agrad | | C B 6.180 agcarb | | C B 6.160 agolig | | C 5.650 agolig |
| | | C B 6.220 agcarb | | C 6.030 agolig | | C D 5.970 agrad | | C 5.650 agrad |
| | | C D 6.078 agreed | | C D 5.910 agreed | | D 5.696 agreed | | D 5.124 agreed |
| | | D 5.790 agdest | | D 5.650 agdest | | E 5.240 agdest | | D 4.780 agdest |

Vegetatividad en todas las aguas y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | ANOVA p-Valor | 24 HORAS |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------|
| <i>E. coli</i> ATCC | <.0001 | A 6.570 agbic | <.0001 | A 6.940 mnut | <.0001 | A 7.220 Mnut | <.0001 | A 7.190 mnut |
| | | A 6.560 mnut | | B 6.420 agbic | | B 6.240 agbic | | B 6.050 agbic |
| | | B A 6.310 agrad | | C B 6.160 agrad | | B 6.230 agolig | | B 6.040 agolig |
| | | B A 6.290 agcarb | | C B D 6.080 agolig | | B 6.160 agcarb | | B 5.810 agcarb |
| | | B C 6.150 agolig | | C E D 6.000 agcarb | | C B 5.820 agssh | | B 5.780 agssh |
| | | D C 5.920 agssh | | C E D 5.856 agssh | | C 5.620 agrad | | C 5.310 agrad |
| | | D C 5.882 agred | | E D 5.696 agred | | C 5.410 agdest | | D 4.906 agred |
| | | D 5.730 agdest | | E 5.650 agdest | | C 5.410 agred | | D 4.830 agdest |
| <i>E. coli</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A 6.730 mnut | <.0001 | A 7.060 mnut | <.0001 | A 7.310 Mnut | <.0001 | A 7.230 mnut |
| | | A 6.660 agssh | | B 6.570 agolig | | B 6.510 agssh | | B 6.140 agbic |
| | | A 6.620 agolig | | B 6.550 agbic | | B 6.490 agbic | | B 6.130 agcarb |
| | | A 6.610 agbic | | B 6.510 agssh | | C B 6.130 agolig | | B 6.070 agssh |
| | | B 6.160 agcarb | | C 6.040 agcarb | | C D 6.020 agcarb | | B 5.830 agolig |
| | | B 6.084 agred | | D C 5.880 agdest | | C D E 5.706 agred | | C 5.104 agred |
| | | B 6.040 agdest | | D C 5.848 agred | | D E 5.610 agdest | | C 5.100 agdest |
| | | B 5.790 agrad | | D 5.560 agrad | | E 5.290 agrad | | C 4.950 agrad |

Vegetatividad en todas las aguas y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 1ª HORA | ANOVA p-Valor | 2ª HORA | ANOVA p-Valor | 3ª HORA | ANOVA p-Valor | 24 HORAS |
|-----------------------------------|------------------|---|------------------|---|------------------|---|------------------|---|
| <i>Pseud. aer.</i> ATCC | <.0001 | A 6.840 mnut B 6.190 agrad B 6.130 agssh B 6.070 agolig B 6.020 agcarb C 5.730 agdest C 5.588 agreed C 5.450 agbic | <.0001 | A 6.940 mnut B 6.080 agssh B 6.010 agolig B 6.000 agrad C B 5.880 agcarb C D 5.650 agdest D 5.470 agbic D 5.360 agreed | <.0001 | A 7.390 mnut B 5.990 agcarb B 5.790 agbic B 5.690 agssh B 5.660 agolig B 5.650 agrad C 5.240 agdest C 5.042 agreed | <.0001 | A 6.930 mnut B 5.770 agcarb B 5.720 agbic C B 5.600 agssh C 5.410 agolig C 5.410 agrad D 5.050 agdest D 4.788 agreed |
| <i>Pseud. aer.</i> Aisl. Clín. | <.0001 | A 6.970 mnut B 6.610 agcarb C 6.210 agolig C 6.210 agbic C 6.130 agssh D C 5.930 agdest D 5.750 agrad D 5.716 agreed | <.0001 | A 7.140 mnut B 6.380 agssh B 6.370 agolig C B 6.130 agcarb C D 5.850 agbic E D 5.650 agdest E 5.480 agreed F 5.040 agrad | <.0001 | A 7.430 mnut B 6.210 agolig B 6.180 agssh B 6.120 agcarb C 5.780 agrad D C 5.590 agbic D E 5.278 agreed E 5.240 agdest | <.0001 | A 6.930 mnut B 6.000 agssh B 5.970 agcarb C B 5.734 agrad C B 5.730 agolig C 5.620 agbic D 5.110 agdest D 4.810 agreed |

Vegetatividad en todas las aguas y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística

| | ANOVA p-Valor | 48 HORAS | ANOVA p-Valor | 72 HORAS | ANOVA p-Valor | 96 HORAS | ANOVA p-Valor | 120 HORAS |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> SG1 | <.0001 | A 7.550 mnut | <.0001 | A 7.800 mnut | <.0001 | A 7.790 Mnut | <.0001 | A 7.610 mnut |
| | | B 6.990 agssh | | B 6.870 agssh | | B 6.750 agssh | | B 6.710 agssh |
| | | C B 6.750 agbic | | C B 6.690 agbic | | B 6.660 agbic | | C B 6.560 agbic |
| | | C B 6.690 agcarb | | C B 6.600 agcarb | | B 6.460 agcarb | | C D 6.330 agcarb |
| | | C B 6.690 agolig | | C D 6.540 agolig | | C B 6.380 agolig | | C D 6.290 agolig |
| | | C B 6.670 agrad | | C D 6.450 agrad | | C B 6.290 agrad | | E D 6.230 agrad |
| | | C 6.610 agdest | | D 6.362 agdest | | C B 6.270 agdest | | E D 6.060 agdest |
| | | D 5.970 agreed | | E D 5.970 agreed | | C 5.970 agreed | | E 5.970 agreed |

| ANOVA p-Valor | | 48 HORAS | | ANOVA p-Valor | | 72 HORAS | | ANOVA p-Valor | | 96 HORAS | | ANOVA p-Valor | | 120 HORAS | |
|---|--|--|--------|--|--------|--|--------|--|--|----------|--|------------------|--|-----------|--|
| L E G u I m S G 1 N p E h L i L l A a | Vegetatividad en agua Sulf. Sód. Hipert. y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística | | | | | | | | | | | | | | |
| | <.0001 | A 7.550 mnut B 6.990 agssh C 6.610 adest | <.0001 | A 7.800 mnut B 6.870 agssh C 6.362 adest | <.0001 | A 7.790 Mnut B 6.750 agssh C 6.270 Adest | <.0001 | A 7.610 mnut B 6.710 agssh C 6.060 adest | | | | | | | |
| | Vegetatividad en agua Bicarbonat. Sódica y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística | | | | | | | | | | | | | | |
| | <.0001 | A 7.550 mnut B 6.750 agbic B 6.610 agdest | <.0001 | A 7.800 mnut B 6.690 agbic C 6.362 agdest | <.0001 | A 7.790 Mnut B 6.660 agbic C 6.270 adest | <.0001 | A 7.610 mnut B 6.560 agbic C 6.060 agdest | | | | | | | |
| | Vegetatividad en agua Carbogaseosa y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística | | | | | | | | | | | | | | |
| | <.0001 | A 7.550 mnut B 6.690 agcarb B 6.610 agdest | <.0001 | A 7.800 mnut B 6.600 agcarb C 6.362 adest | <.0001 | A 7.790 Mnut B 6.460 agcarb B 6.970 adest | <.0001 | A 7.630 mnut B 6.340 agcarb B 6.520 agdest | | | | | | | |
| | Vegetatividad en agua Oligomineral y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística | | | | | | | | | | | | | | |
| | <.0001 | A 7.550 mnut B 6.690 agolig B 6.610 agdest | <.0001 | A 7.800 mnut B 6.540 agolig B 6.362 agdest | <.0001 | A 7.790 Mnut B 6.380 agolig B 6.270 agdest | <.0001 | A 7.610 mnut B 6.290 agolig B 6.060 adest | | | | | | | |
| | Vegetatividad en agua Radiactiva y controles según tiempo de exposición. Significancia estadística | | | | | | | | | | | | | | |
| | <.0001 | A 7.350 mnut B 6.670 agrad B 6.610 agdest | <.0001 | A 7.800 mnut B 6.450 agrad B 6.362 adest | <.0001 | A 7.790 Mnut B 6.290 agrad B 6.270 adest | <.0001 | A 7.610 mnut B 6.230 agrad B 6.060 adest | | | | | | | |

**BLOQUE DE TABLAS -IV-
(nº total de tablas 21)**

**IDENTIDAD INICIAL Y PORCENTAJE DE CAMBIOS ENZIMÁTICOS DE LOS
GÉRMENES DEL ESTUDIO EXPUESTOS A LAS AGUAS
MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) ATCC / Ag. S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 33,3 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) Aislado Clínico / Ag. S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 0 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasa | 10 | 5 | 0 | 0 |
| Cambios Enzimáticos | | 57,2 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* ATCC / Ag. S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|----------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | ≥40 | ≥40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 20 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | 30 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-IFosfohidrolasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| β-galactosidasa | 10 | 5 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 55,6 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* Aislado Clínico / Ag. S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | ≥40 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | ≥40 | ≥40 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 20 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil-β-glucosaminidasa | 5 | 5 | 0 | 0 |
| Cambios Enzimáticos | | 75 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* ATCC / Ag.S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 10 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | ≥40 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 30 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasa | 20 | 20 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-Sfosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 66,7 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* Aislado Clínico / Ag. S.S.H.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 10 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 25 | 25 | 75 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) ATCC / Ag. B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | 20 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 20 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 66,7 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) Aislado Clínico / Ag. B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasasa | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasasa | 10 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 42,9 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* ATCC / Ag .B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 10 | ≥40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | ≥40 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-Fosfohidrolasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| β-galactosidasa | 10 | 5 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 44,4 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* Aislado Clínico / Ag. B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 10 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 0 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | ≥40 | ≥40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| Naftol-A-S-Bfosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 20 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil-β-glucosaminidasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimaticos | | 62,5 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* ATCC / Ag. B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | 30 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 30 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasa | 20 | 30 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 66,7 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* Aislado Clínico / Ag. B.S.

| Enzima Investigada | Original | Ag. B.S. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 5 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Tripsina | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 10 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 87,5 | 25 | 75 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) ATCC / Ag.C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 33,3 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) Aislado Clínico / Ag.C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasa | 10 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 42,9 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* ATCC / Ag. C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 20 | ≥ 40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | 20 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-BI-Fosfohidrolasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| α -galactosidasa | 0 | 5 | 0 | 0 |
| β -galactosidasa | 10 | 10 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 55,6 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* Aislado Clínico / Ag. C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | ≥ 40 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 0 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 20 | ≥ 40 | ≥ 40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥ 40 | 30 | ≥ 40 | ≥ 40 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 5 | 0 | 0 |
| β -galactosidasa | 20 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil- β -glucosaminidasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 87,5 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* ATCC / Ag. C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | 20 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 30 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasas | 20 | 30 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasas | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 77,8 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* Aislado Clínico / Ag. C.G.

| Enzima Investigada | Original | Ag. C.G. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 20 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 30 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasas | 10 | 30 | 10 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 62,5 | 25 | 75 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) ATCC / Ag. Oligom. Bicarb. Mixt .

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 16,7 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *S. aur.* Coag. (+) Aislado Clínico / Ag. Oligom. Bicarb. Mixt.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 10 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasa | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasa | 10 | 5 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 42,9 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* ATCC / Ag. Oligom. Bicarb. Mixt.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 10 | ≥40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | 10 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-BI-Fosfohidrolasa | 5 | 0 | 5 | 5 |
| β-galactosidasa | 10 | 10 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 33,3 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* Aislado Clínico / Ag. Oligom. Bicarb. Mixt.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 20 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 0 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 20 | ≥40 | ≥40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 5 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 20 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil-β-glucosaminidasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 62,5 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado/*Pseud.aer.* ATCC/Ag.Oligom.Bicarb.Mixt.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | 20 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasa | 20 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 5 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 22,3 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado/*Pseud.aer.* Aislado Clínico/Ag.Oligom.Bicarb.Mixt.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Olg. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 62,5 | 25 | 75 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado/*S.aur.*Coag.(+) ATCC/Ag.Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | 30 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 20 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasa | 5 | 10 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 66,7 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado/*S.aur.*Coag.(+) Aislado Clínico/Ag.Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasa | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasa | 10 | 5 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 42,9 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* ATCC / Ag. Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 30 | ≥40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | ≥40 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-BIFosfohidrolasa | 5 | 10 | 5 | 5 |
| α-galactosidasa | 0 | 5 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 10 | 20 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 55,6 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *E. coli* Aislado Clínico / Ag. Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | 30 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 5 | ≥40 | ≥40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 5 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 20 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil-β-glucosaminidasa | 5 | 20 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 37,5 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* ATCC / Ag. Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | ≥40 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 30 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasa | 20 | 30 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-S-BI fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 55,6 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseud. aer.* Aislado Clínico / Ag. Rad.

| Enzima Investigada | Original | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 10 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 5 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Tripsina | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 50 | 25 | 75 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Staphilococcus aureus* Coag. (+) ATCC / Ag. Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red. |
|---------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | 20 | ≥40 | ≥40 | 30 | ≥40 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 5 | 20 | 20 | 5 | 20 | 5 | 10 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | 20 | ≥40 | ≥40 | 20 | ≥40 | 30 |
| α-Glucosidasa | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 |
| % Cambios Enzimáticos | | 33,3 | 66,7 | 33,3 | 16,7 | 66,7 | 16,7 | 33,3 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Staphilococcus aureus* Coag. (+) Aislado Clinico / Ag Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red. |
|---------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Fosfatasa Alcalina | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 |
| Esterasa (C1) | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C8) | 10 | 5 | 20 | 20 | 10 | 20 | 5 | 10 |
| Leucina Arilamidasa | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| Cistina Arilamidasa | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | ≥40 | 30 | 30 | 30 | ≥40 | 20 | ≥40 |
| α-Glucosidasa | 10 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 57,2 | 42,9 | 42,9 | 42,9 | 42,9 | 57,2 | 42,9 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Escherichia coli* ATCC / Ag. Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | ≥40 | 10 | 20 | 10 | 30 | ≥40 | 10 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 30 | 30 | ≥40 | 20 | 10 | ≥40 | 20 | 20 |
| Naftol-A-S-BI-Fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 | 5 |
| α-galactosidasa | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 10 | 5 | 5 | 10 | 10 | 20 | 5 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 55,6 | 44,4 | 55,6 | 33,3 | 55,6 | 44,4 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Escherichia coli* Aislado Clínico / Ag. Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 30 | ≥40 | 10 | ≥40 | 20 | 30 | 30 | 20 |
| Esterasa (C ₁) | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | ≥40 | 10 | 20 | 20 | 5 | ≥40 | ≥40 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Fosfatasa Ácida | ≥40 | 30 | ≥40 | 30 | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 |
| β-galactosidasa | 20 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 | 10 |
| N-acetil-β-glucosaminidasa | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 75 | 62,5 | 87,5 | 62,5 | 37,5 | 62,5 | 87,5 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseudomonas aeruginosa* ATCC / Ag. Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 10 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 0 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 5 | 10 | 5 | 5 | 10 | 10 | 5 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 20 | ≥40 | 30 | 20 | 20 | ≥40 | 20 | 30 |
| Lipasa (C ₁₄) | 10 | 30 | 30 | 30 | 10 | 30 | 5 | 5 |
| Leucina Arilamidasa | 20 | 20 | 30 | 30 | 5 | 30 | 5 | 5 |
| Valina Arilamidasa | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tripsina | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 66,7 | 66,7 | 77,8 | 22,3 | 55,6 | 44,5 | 55,6 |

Nanomoles de Sustrato Hidrolizado / *Pseudomona aeruginosa* Aislado Clínico / Ag. Experiment.

| Enzima Investigada | Original | Ag. S.S.H. | Ag. B.S. | Ag. C.G. | Ag. Olg. | Ag. Rad. | Ag. Dest. | Ag. Red |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Fosfatasa Alcalina | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Esterasa (C ₁) | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 10 |
| Esterasa Lipasa (C ₈) | 10 | 5 | 5 | 20 | 5 | 5 | 10 | 5 |
| Lipasa (C ₁₄) | 5 | 5 | 0 | 30 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| Leucina Arilamidasa | 10 | 10 | 10 | 30 | 5 | 10 | 10 | 5 |
| Tripsina | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Fosfatasa Ácida | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| % Cambios Enzimáticos | | 25 | 87,5 | 62,5 | 62,5 | 50 | 25 | 75 |

**EXPRESIÓN COLORIMÉTRICA DE LA IDENTIDAD
INICIAL Y DE LOS CAMBIOS ENZIMÁTICOS DE LOS
GÉRMENES EXPUESTOS A LAS AGUAS
MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**



Quantité de substrat hydrolysé
Quantity of hydrolysed substrate

Activité chiffrée
Activity mark
Control — Témoïn

2 - naphthyl - phosphate

2 - naphthyl - butyrate

2 - naphthyl - caprylate

2 - naphthyl - myristate

L - leucyl - 2 - naphthylamide

L - valyl - 2 - naphthylamide

L - cystyl - 2 - naphthylamide

N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide

N-glutaryl-phénylalanine-2-naphthylamide

2 - naphthyl - phosphate

Naphtol-AS-Bi-phosphate

6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside

2-naphthyl- β -D-galactopyranoside

Naphtol-AS-Bi- β -D-glucuronide

2-naphthyl- α -D-glucopyranoside

6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside

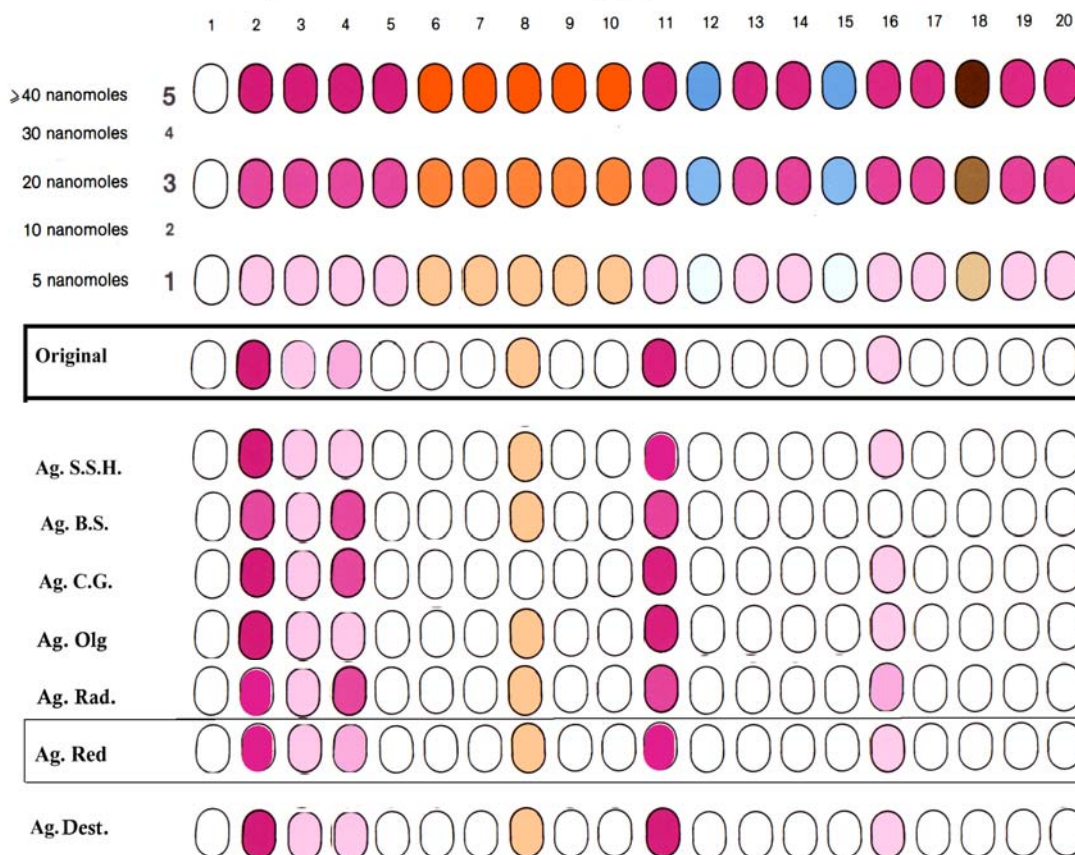
1-naphthyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide

6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside

2-naphthyl- α -L-fucopyranoside

Staphylococcus aureus Coag (+) ATCC

API ZYM





Quantité de substrat hydrolysé
Quantity of hydrolysed substrate

Activité chiffrée
Activity mark

Control – Témoin

2 - naphthyl - phosphate

2 - naphthyl - butyrate

2 - naphthyl - caprylate

2 - naphthyl - myristate

L - leucyl - 2 - naphthylamide

L - valyl - 2 - naphthylamide

L - cystyl - 2 - naphthylamide

N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide

N-glutaryl-phénylalanine-2-naphthylamide

2 - naphthyl - phosphate

Naphtol-AS-BI-phosphate

6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside

2-naphthyl- β -D-galactopyranoside

Naphtol-AS-BI- β -D-glucuronide

2-naphthyl- α -D-glucopyranoside

6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside

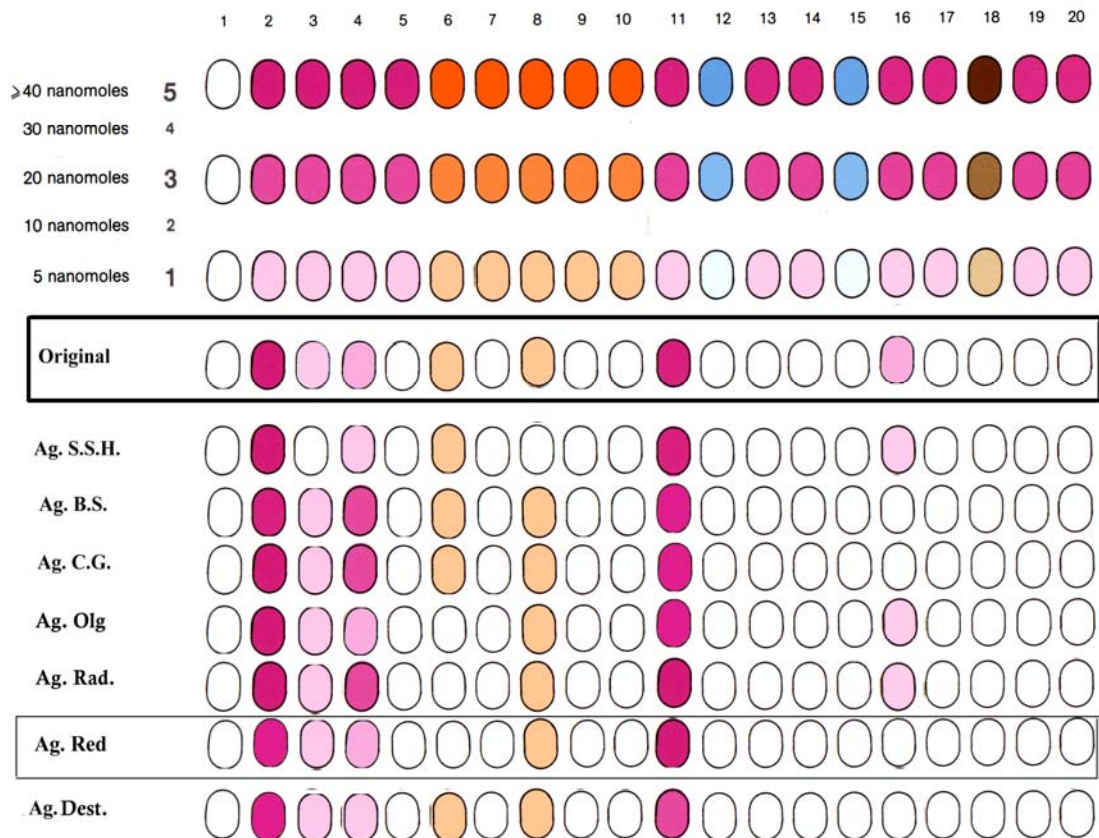
1-naphthyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide

6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside

2-naphthyl- α -L-fucopyranoside

Staphilococcus aureus Coag (+) Aislado Clínico

API ZYM



API ZYM

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|

≥ 40 nanomoles 5
 30 nanomoles 4
 20 nanomoles 3
 10 nanomoles 2
 5 nanomoles 1

Original

Ag. S.S.H.

Ag. B.S.

Ag. C.G.

Ag. Olg

Ag. Rad.

Ag. Red

Ag. Dest.

Ag. Dest.

Original 

Ag. Red

Ag. Dest. .

Activity mark

Control - Témoin

2 - naphtyl - phosphate

2 - naphtyl - butyrate

2 - naphtyl - caprylate

2 - naphtyl - myristate

L - leucyl - 2 - naphthylamide

L - valyl - 2 - naphtylamide

L - cystyl - 2 - naphthylamide

N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide

N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide

2 - naphtyl - phosphate

Naphthol-AS-BI-phosphate

6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside2-naphthyl- β -D-galactopyranosideNaphthol-AS-BI- β -D-glucuronide2-naphthyl- α D-glucopyranoside6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside

1-naphtyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide

6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside2-naphtyl- α L-fucopyranoside

[illegible]

Activité chiffrée
Activity mark
Control – Témoignage

2 - naphtyl - phosphate

2 - naphtyl - butyrate

2 - naphtyl - caprylate

2 - naphtyl - myristate

- leucyl - 2 - naphthyl -

- - valyl - 2 - naphtylam

- - cystyl - 2 - naphthyl

N-benzoyl-DL-arginine-2

N-glutaryl-phénylalanine

2 - naphtyl - phosphate

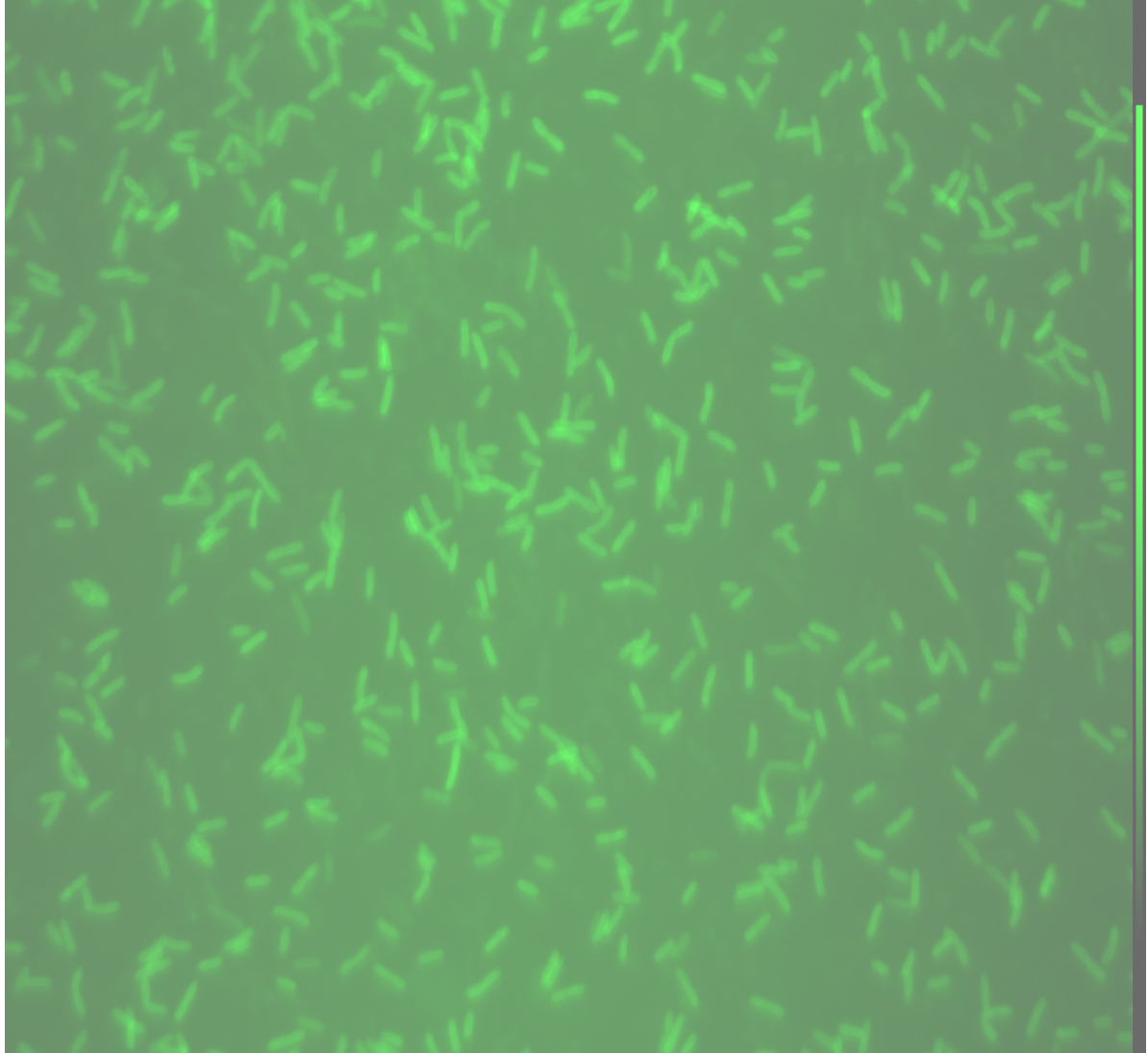
Naphthol-AS-BI-phosphatase

3-Br-2-naphthyl- α D-galactose2-naphtyl- β D-galactopyNaphthol-AS-BI- β -D-glucosylate2-naphtyl- α D-glucopyra6-Br-2-naphtyl- β D-glucose

1-naphtyl-N-acétyl-βD-g

6-Br-2-naphtyl- α D-man2-naphtyl- α L-fucopyran

**EXPRESIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INICIAL
DE LA *Legionella pneumophila* SG1 Y TRAS SU EXPOSICIÓN
A LAS AGUAS MINEROMEDICINALES Y DE CONTROL**



***Legionella pneumophila* SG1 Inmunof.(+)**
(germen empleado en el estudio experimental)



L.pneumoph. en agua S.S.H. Inmunof (-)



L.pneumoph en agua B.C. Inmunof (-)



L.pneumoph. en agua C.G. Inmunof (-)



L.pneumoph. en agua OLIG Inmunof (-)



L.pneumoph. en agua RAD Inmunof (-)

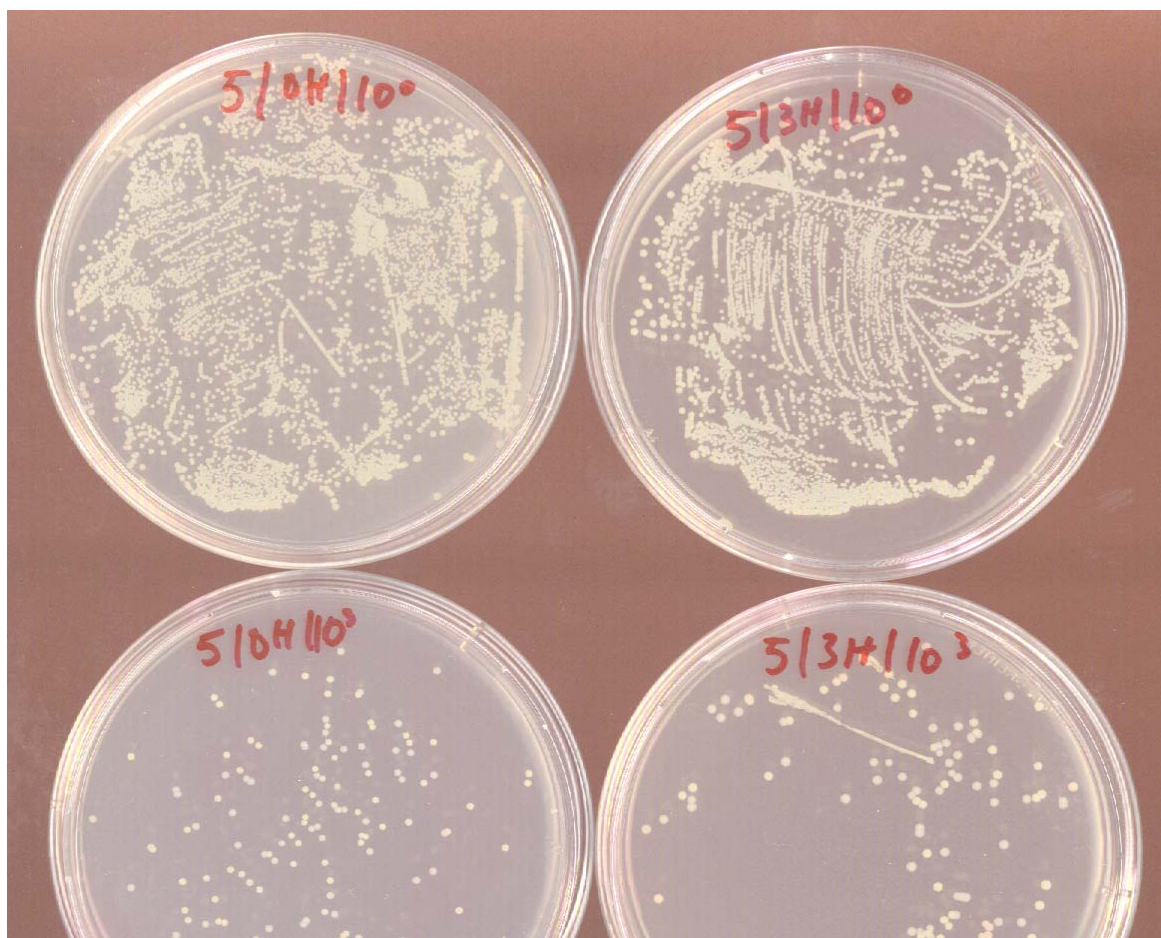


L.pneumoph. en agua DEST Inmunof (-)

**ICONOGRAFÍA DE LA VEGETATIVIDAD
MÁXIMA Y MÍNIMA DEL CRECIMIENTO DE LOS
GÉRMENES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO**

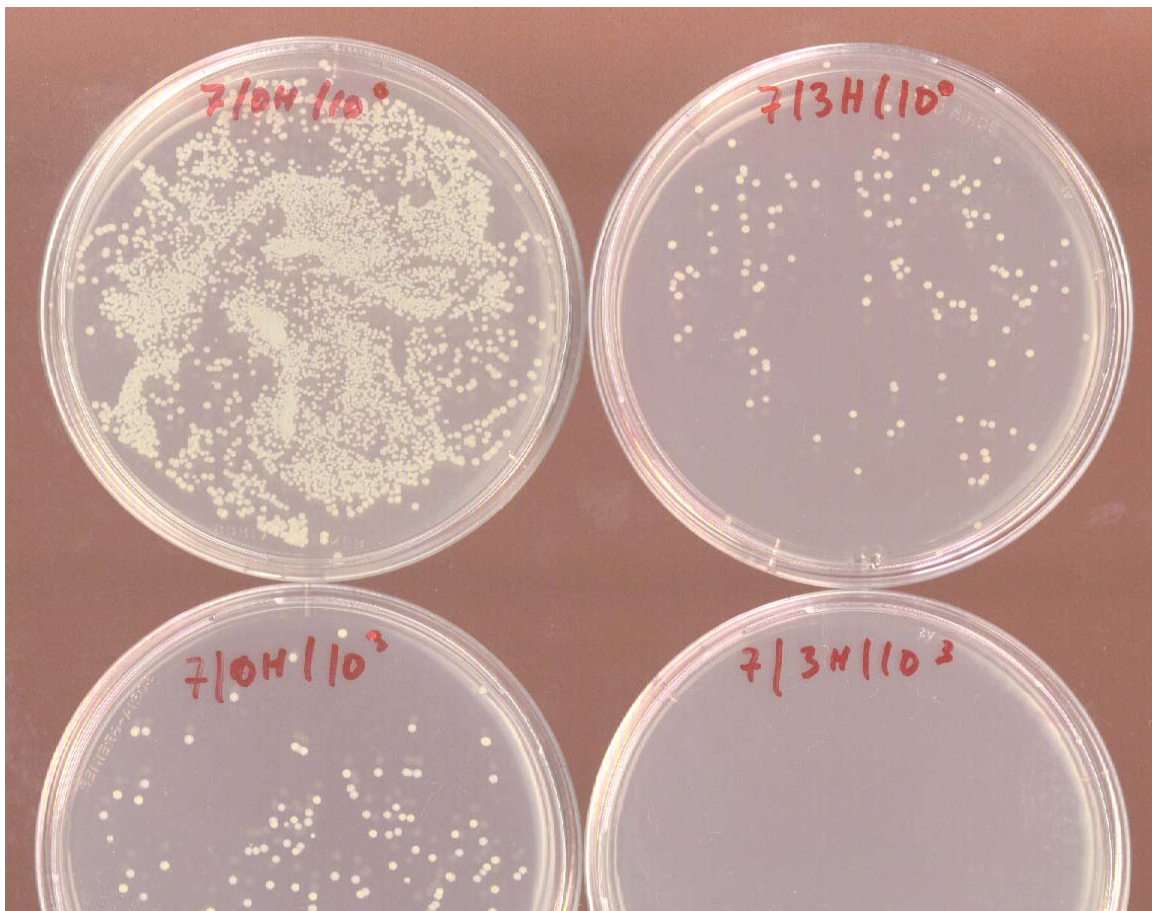
***S. aureus* Coag. (+) ATCC en Ag. B.S. (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad Máxima



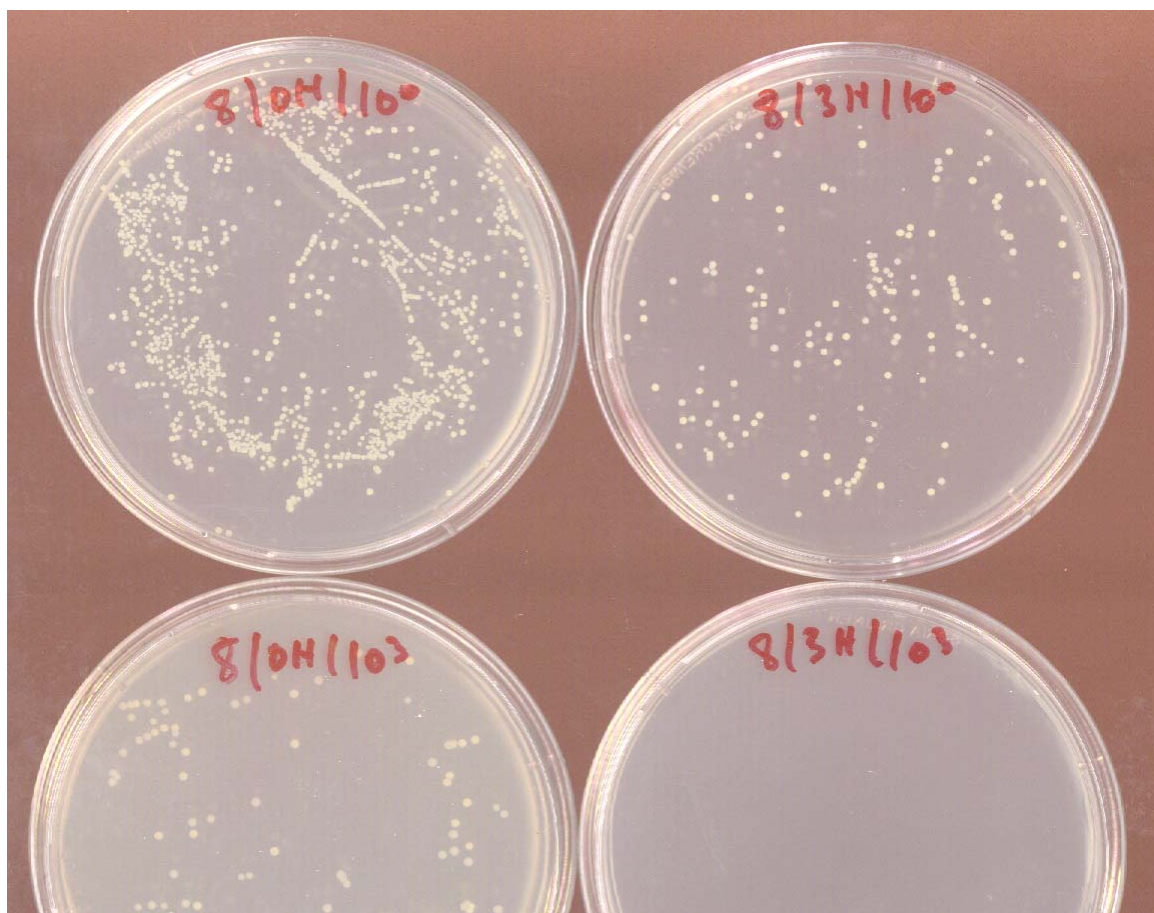
***S. aureus* Coag. (+) ATCC en Ag. RAD. (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad Mínima



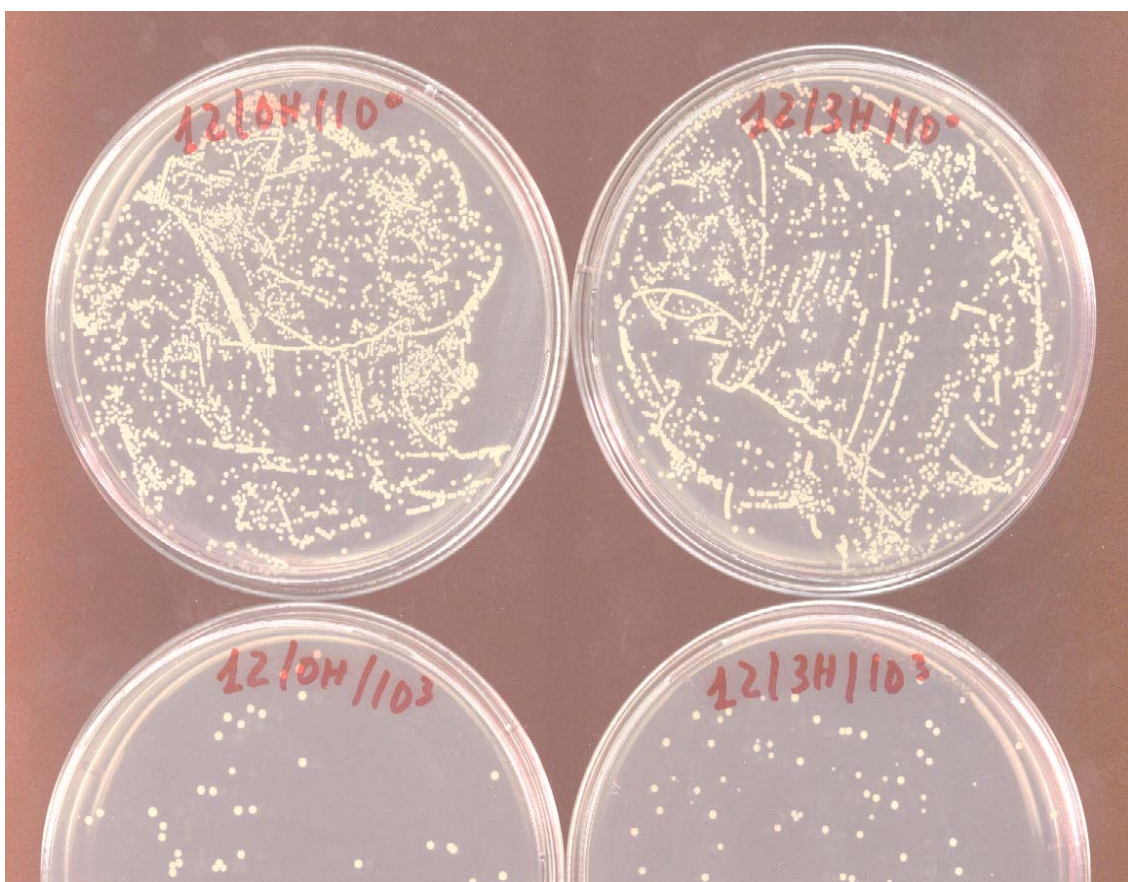
***S. aureus* Coag. (+) ATCC en Ag. Red (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad en el agua de control



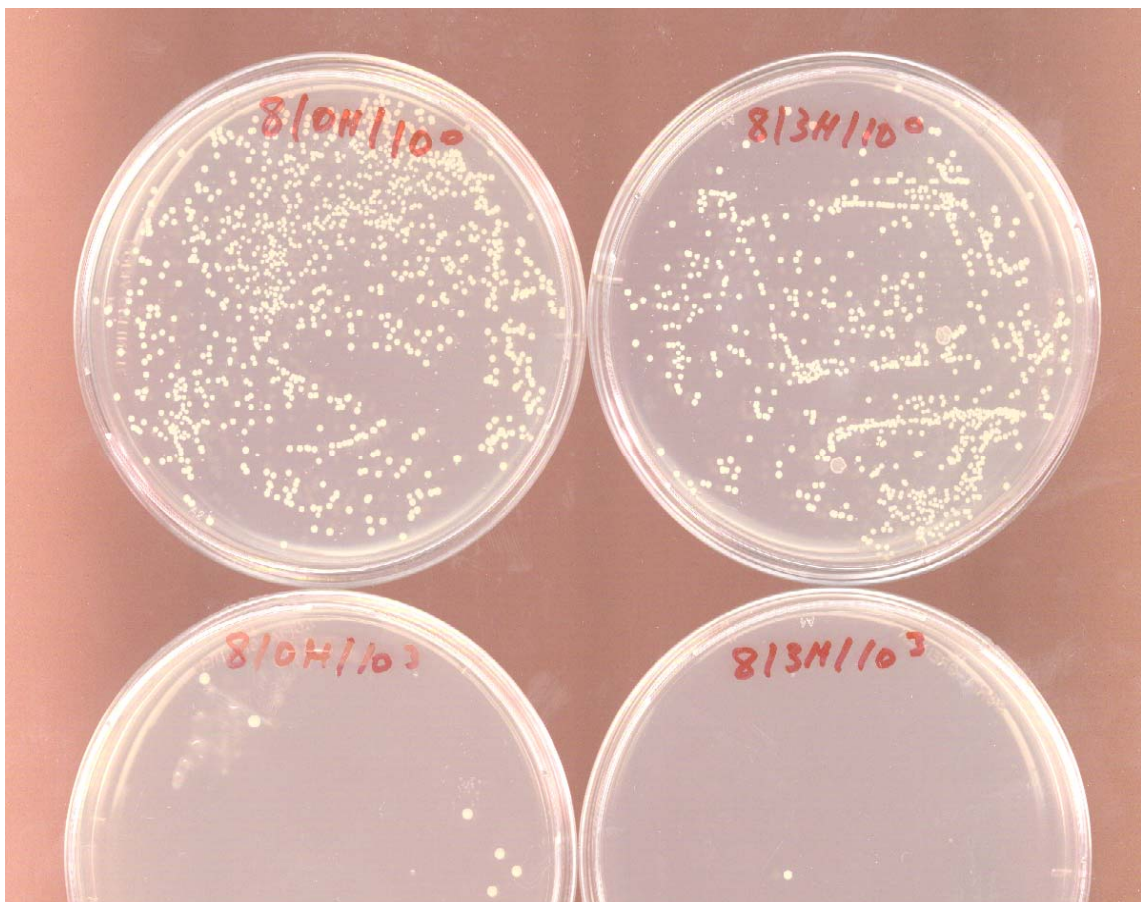
***S. aureus* Coag. (+) de Aisl. Clín. en Ag. B.S. (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad Máxima



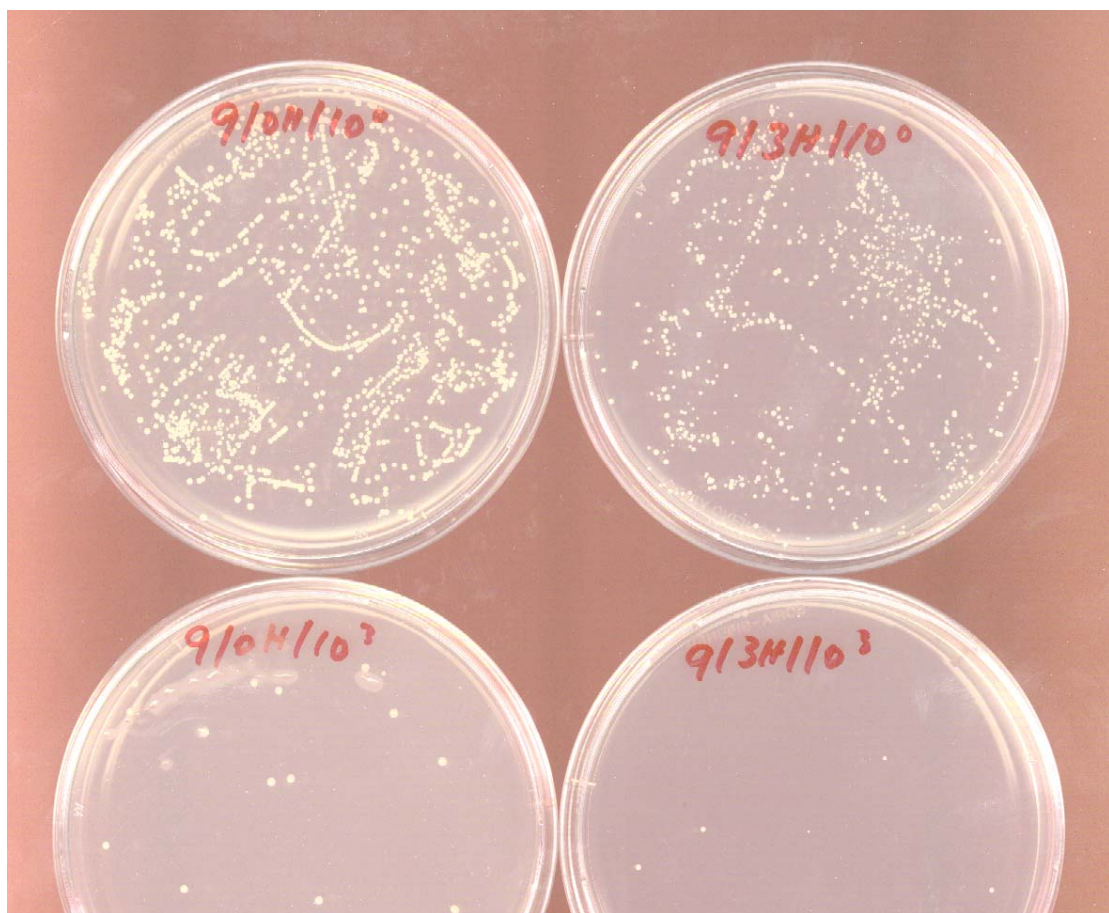
***S. aureus* Coag. (+) de Aisl. Clín. en Ag. OLIG. (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad Mínima



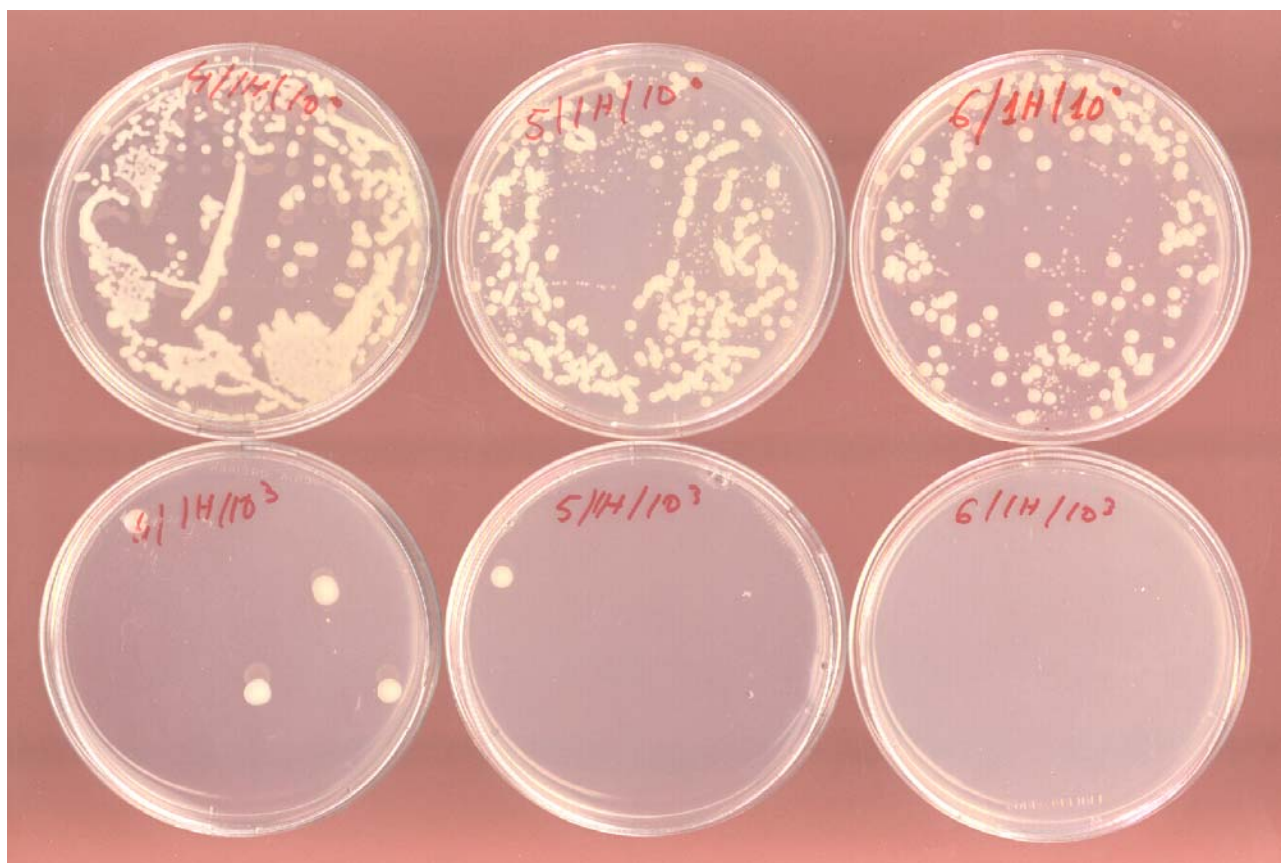
***S. aureus* Coag. (+) de Aisl. Clín. en Ag. Red (0h y 3h exposición)**

Vegetatividad en el agua de control



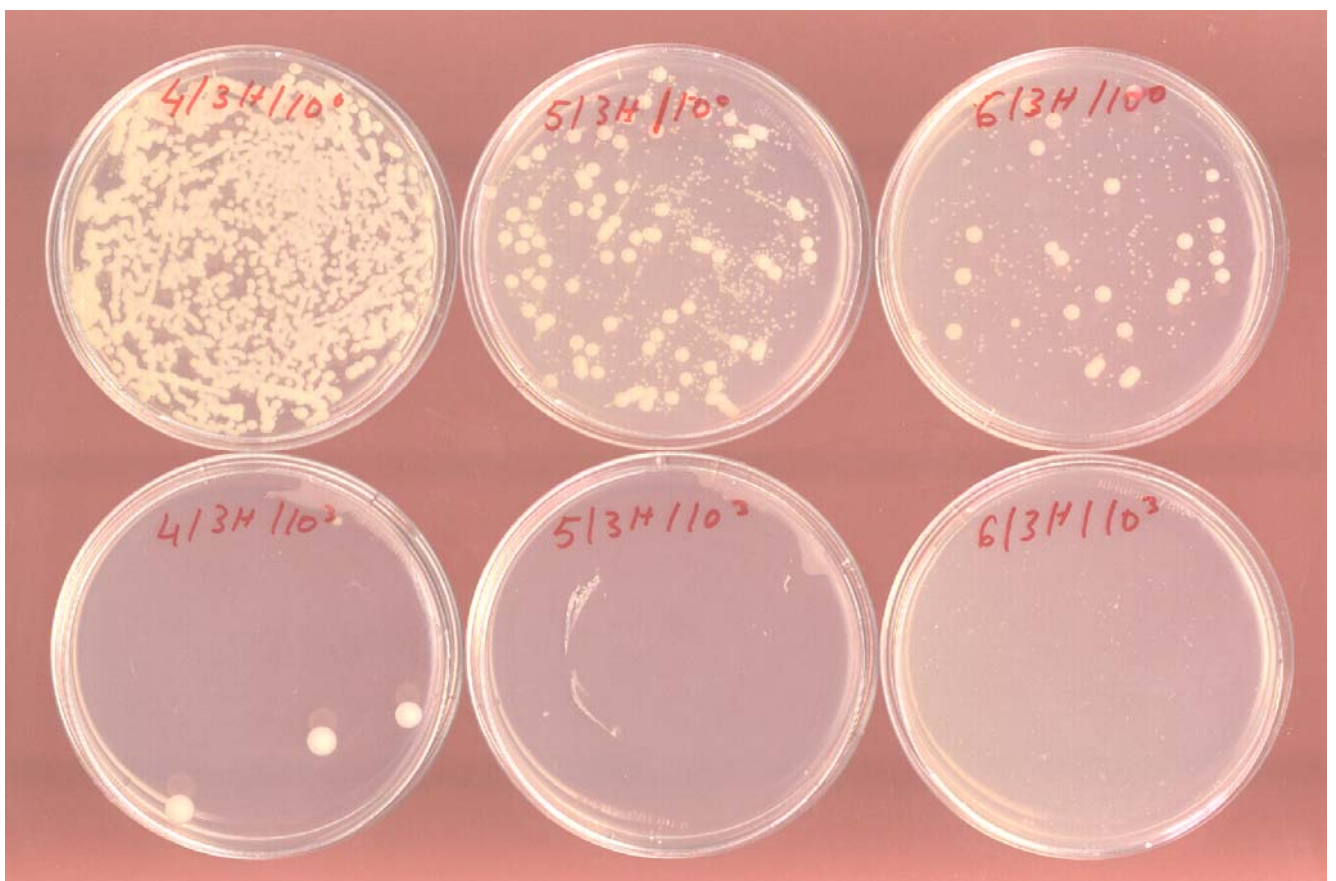
***E. coli* ATCC Vegetatividad en:**

Ag. B.S. (Máxima 1h), Ag. S.S.H. (Mínima 1h), Ag. Red (Mínima 1h)



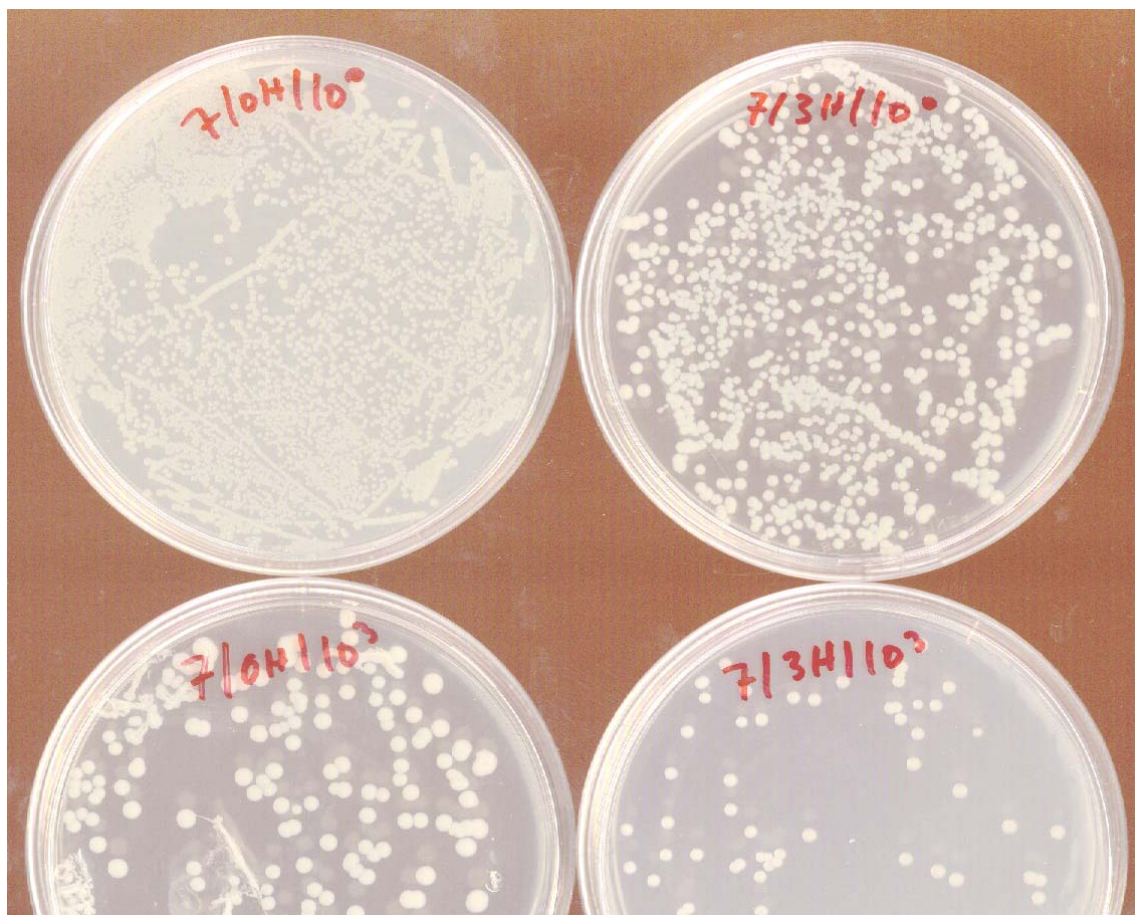
***E. coli* ATCC Vegetatividad en:**

Ag. B.S. (Máxima 3h), Ag. RAD. (Mínima 3h), Ag. Red (Mínima 3h)



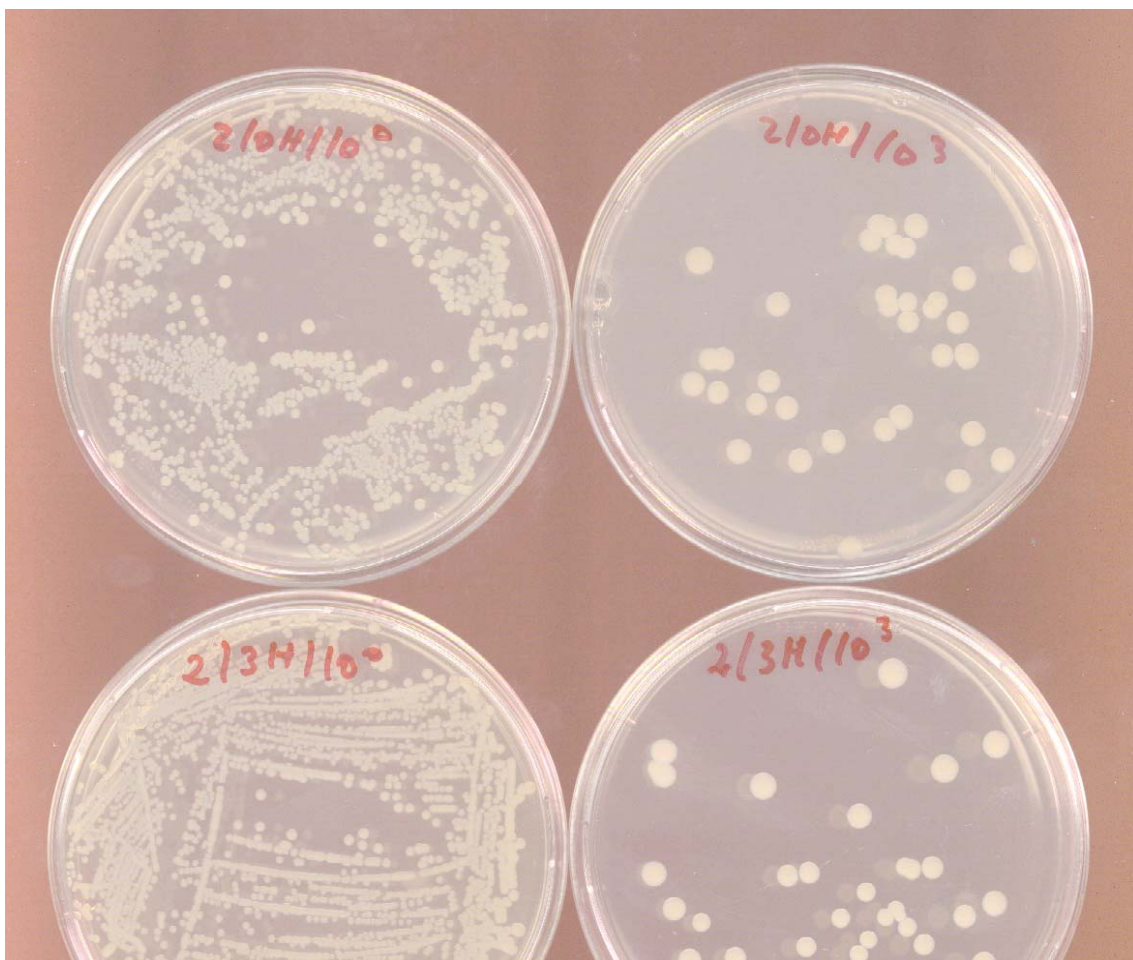
***E. coli* de Aisl. Clín. en Ag. S.S.H. (1h y 3h exposición)**

Vegetatividad Máxima



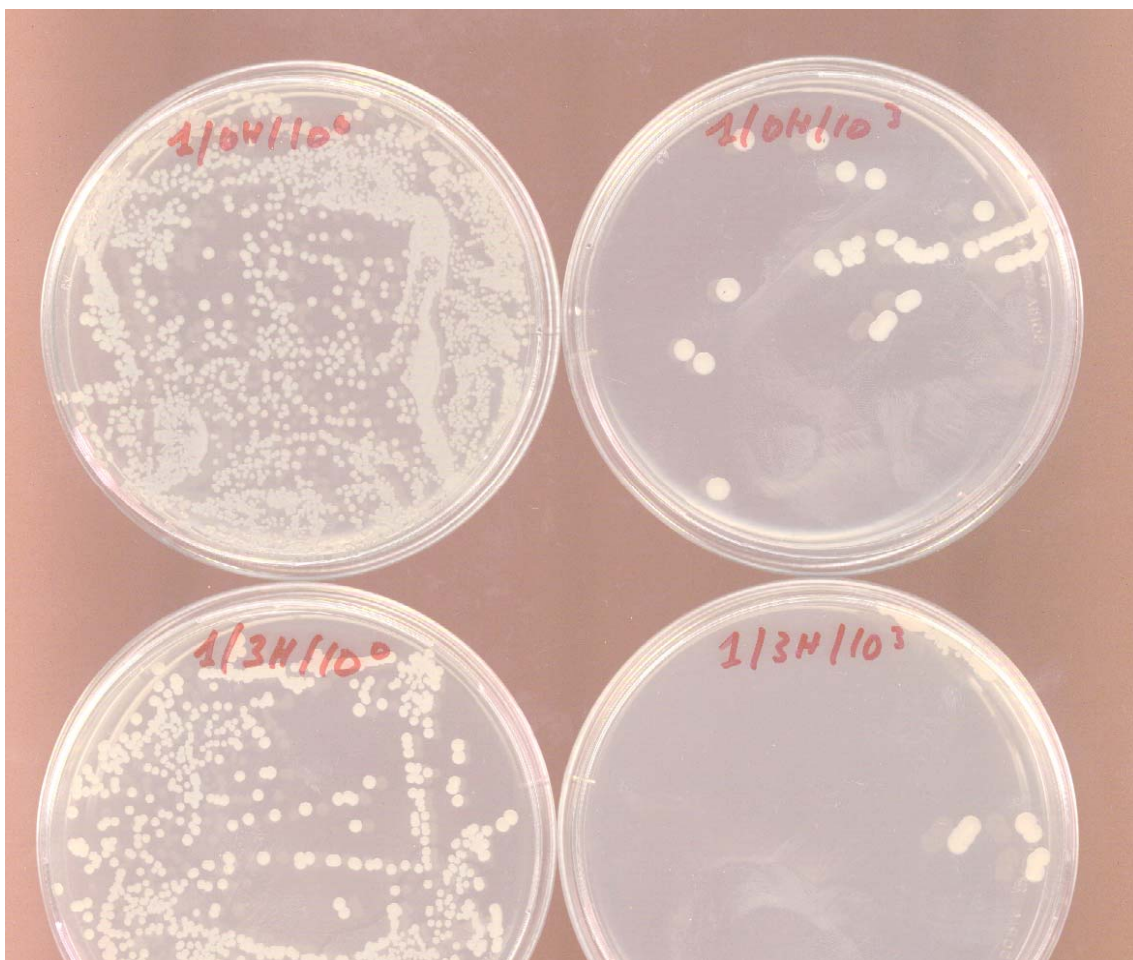
***E. coli* de Aisl. Clín. en Ag. RAD. (1h y 3h exposición)**

Vegetatividad Mínima



***E. coli* de Aisl. Clín. en Ag. Red (1h y 3h exposición)**

Vegetatividad en el agua de control

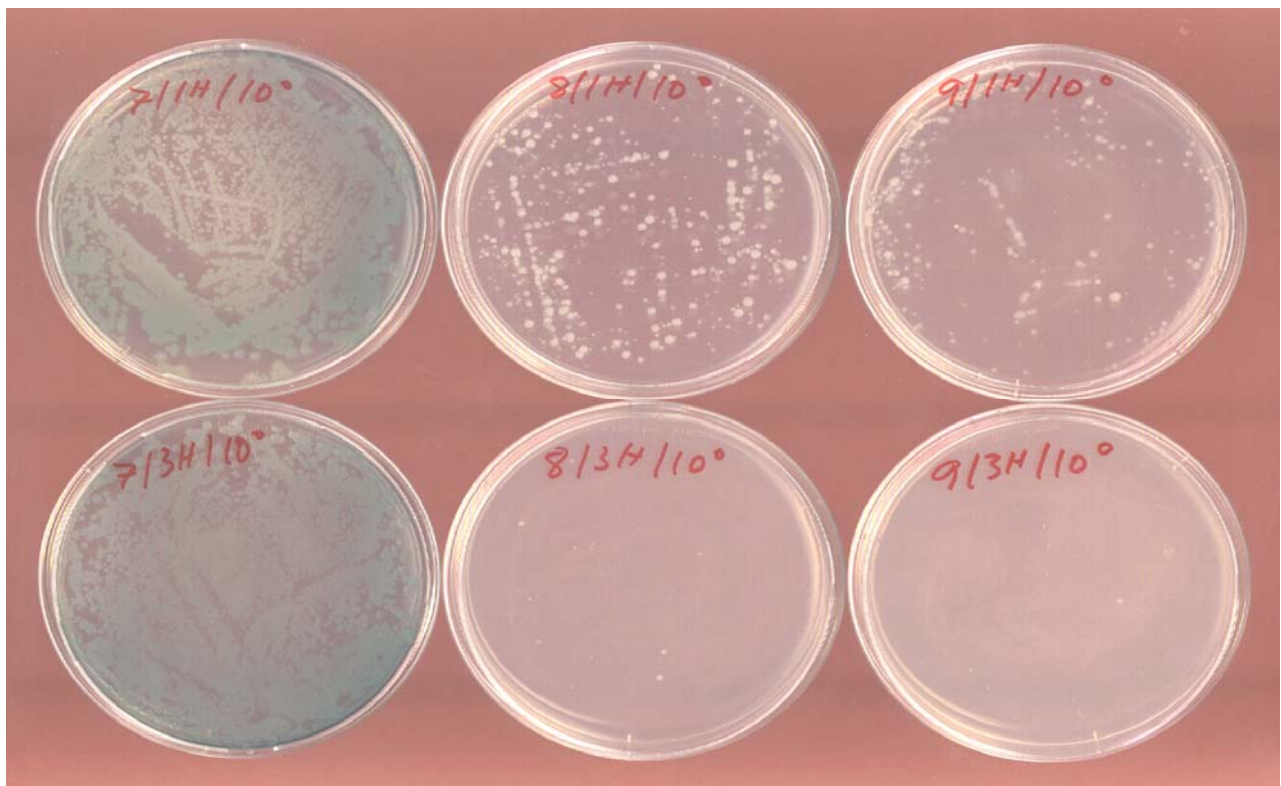


***Pseud. aer.* ATCC Vegetatividad en:**

**Ag. RAD.
(Máxima 1h)**

**Ag. Red
(Mínima 1h)**

**Ag. B.S.
(Mínima 1h)**



**Ag. CRB.
(Máxima 3h)**

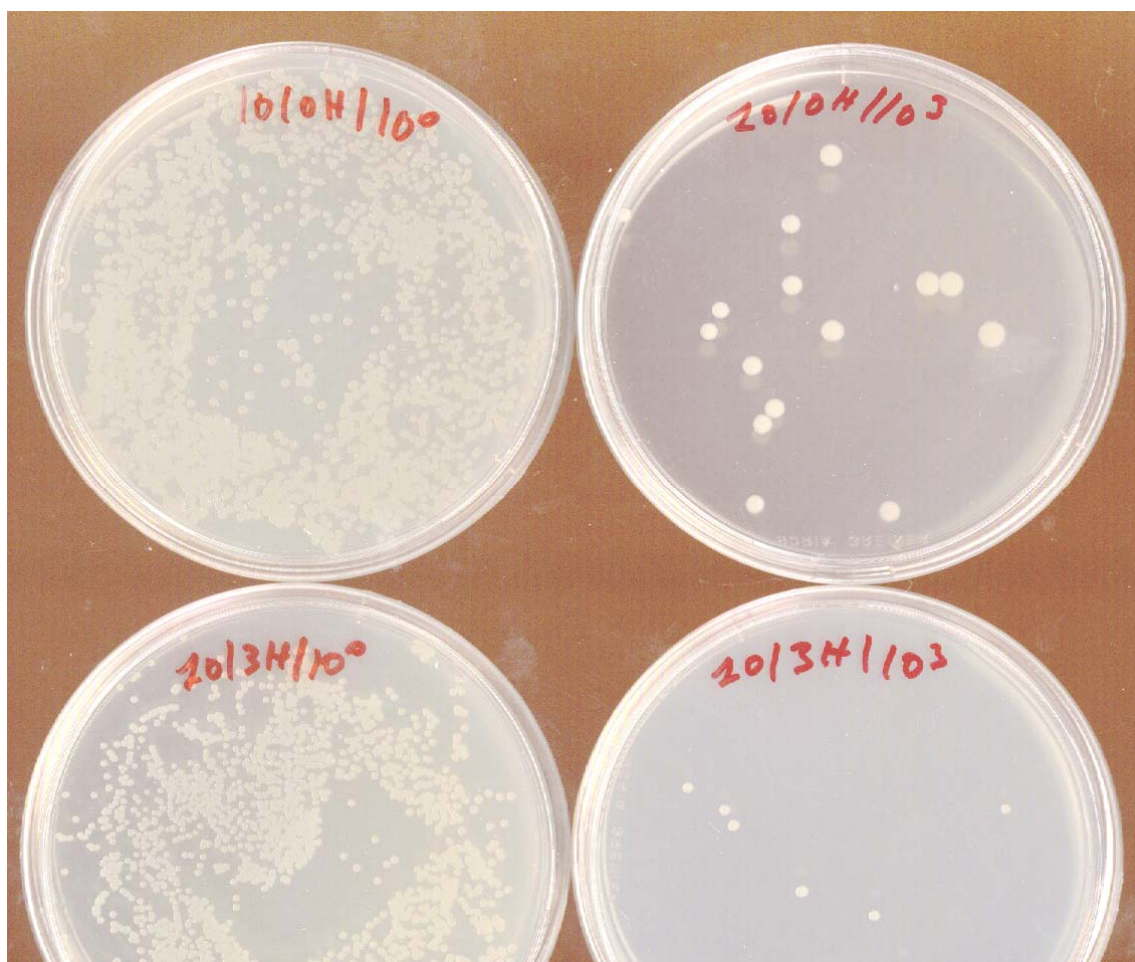
**Ag. RAD.
(Mínima 3h)**

**Ag. Red
(Mínima 3h)**

Vegetatividad de *Pseud. aer.* ATCC

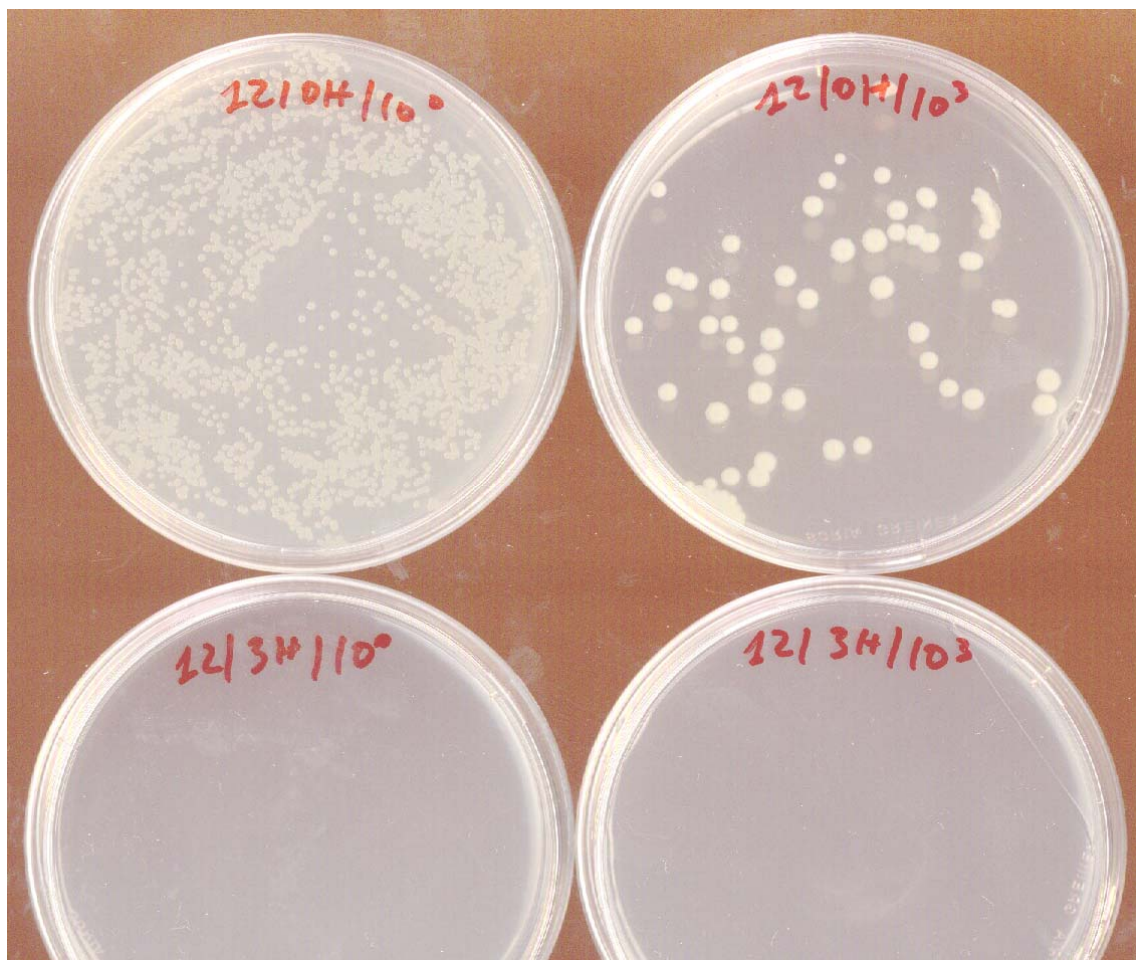
***Pseud. aer.* Aisl. Clín. en Ag. CRB. (1h y 3h exposición)**

Vegetatividad Máxima



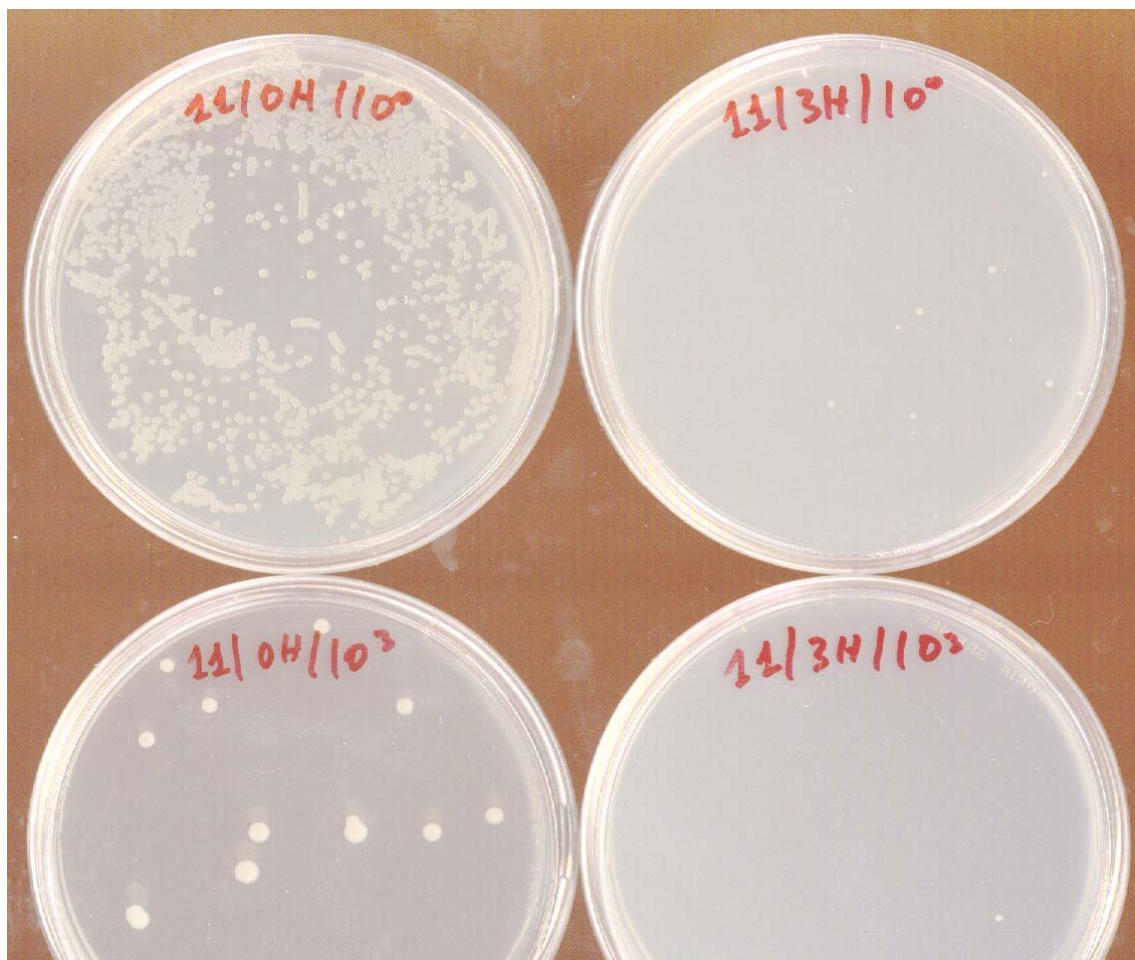
***Pseud. aer.* Aisl. Clín. en Ag. B.S. (1h y 3h exposición)**

Vegetatividad Mínima

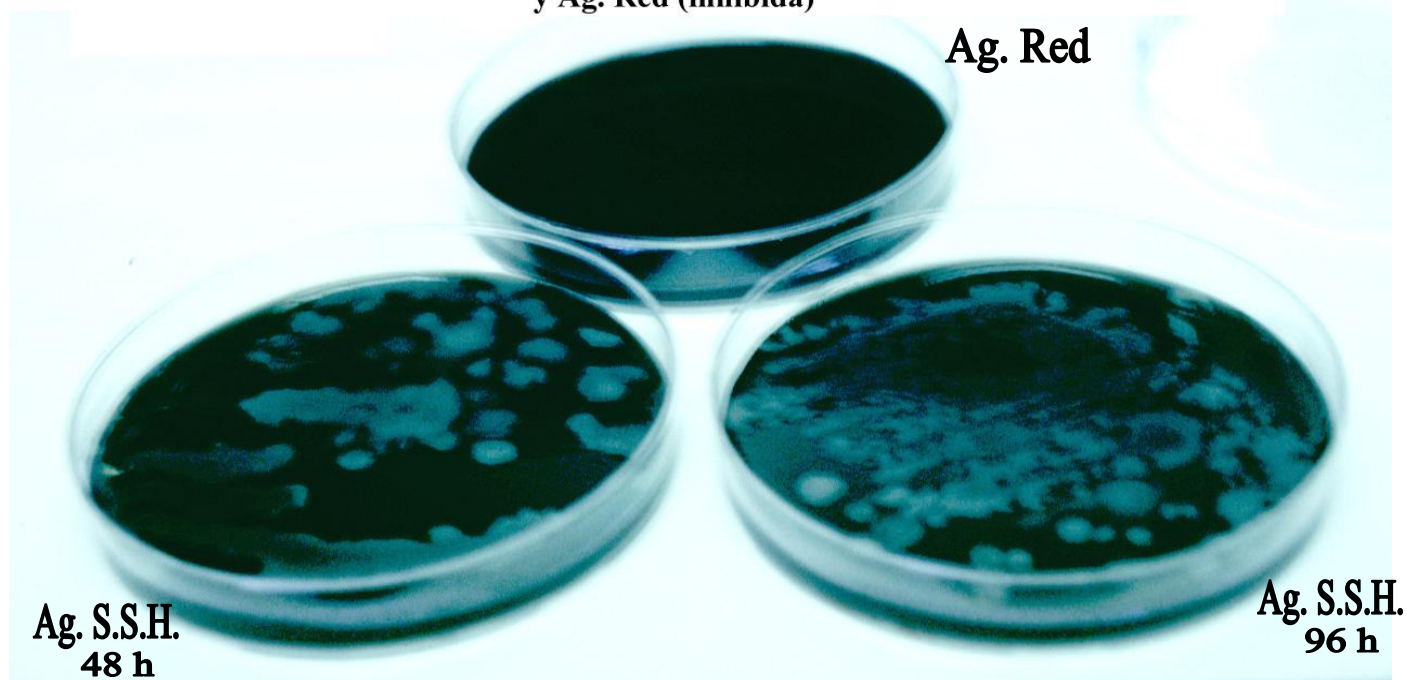


***Pseud. aer.* Aisl. Clín. en Ag. Red (1h y 3h exposición)**

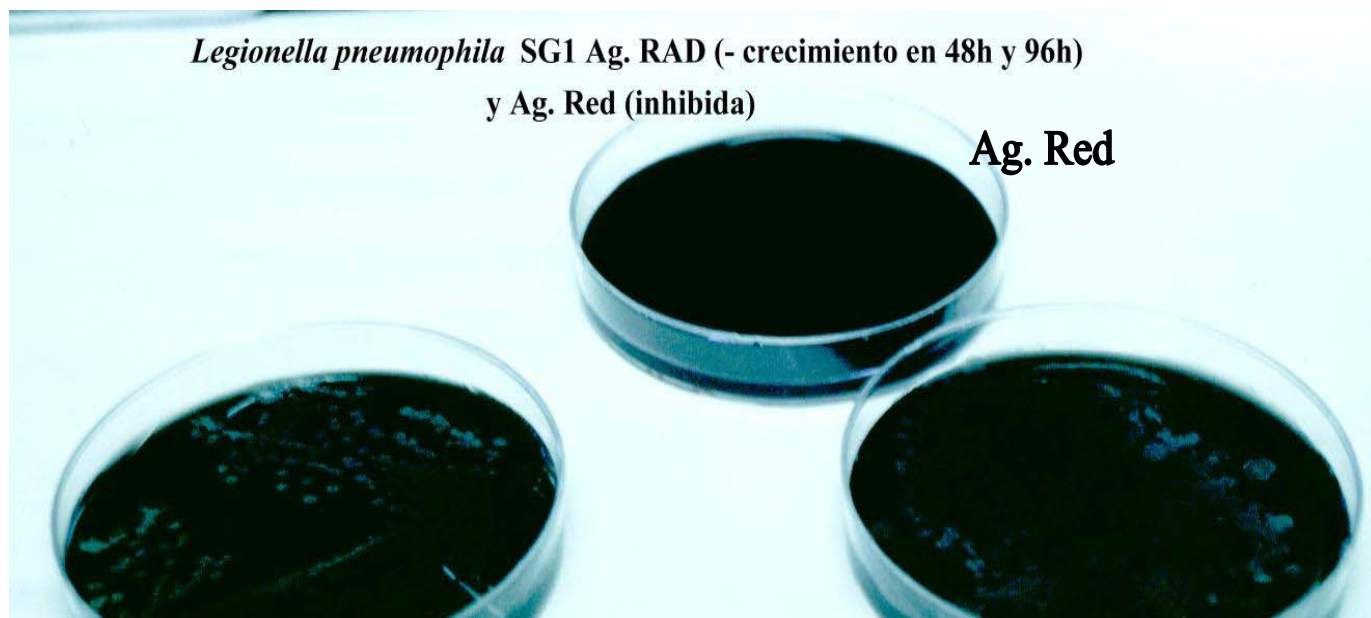
Vegetatividad en el agua de control



Legionella pneumophila SG1 en Ag. S.S.H. (+ crecimiento 48h y 96h)
y Ag. Red (inhibida)

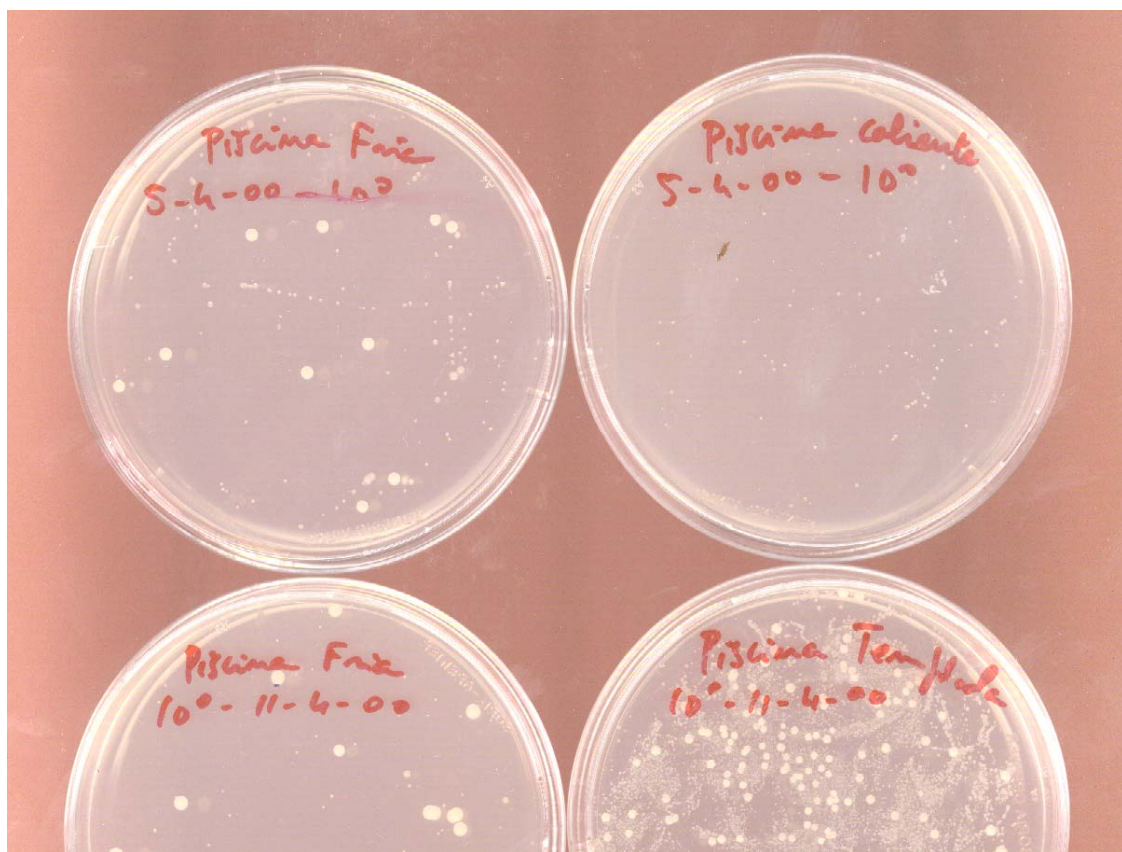


Legionella pneumophila SG1 Ag. RAD (- crecimiento en 48h y 96h)
y Ag. Red (inhibida)



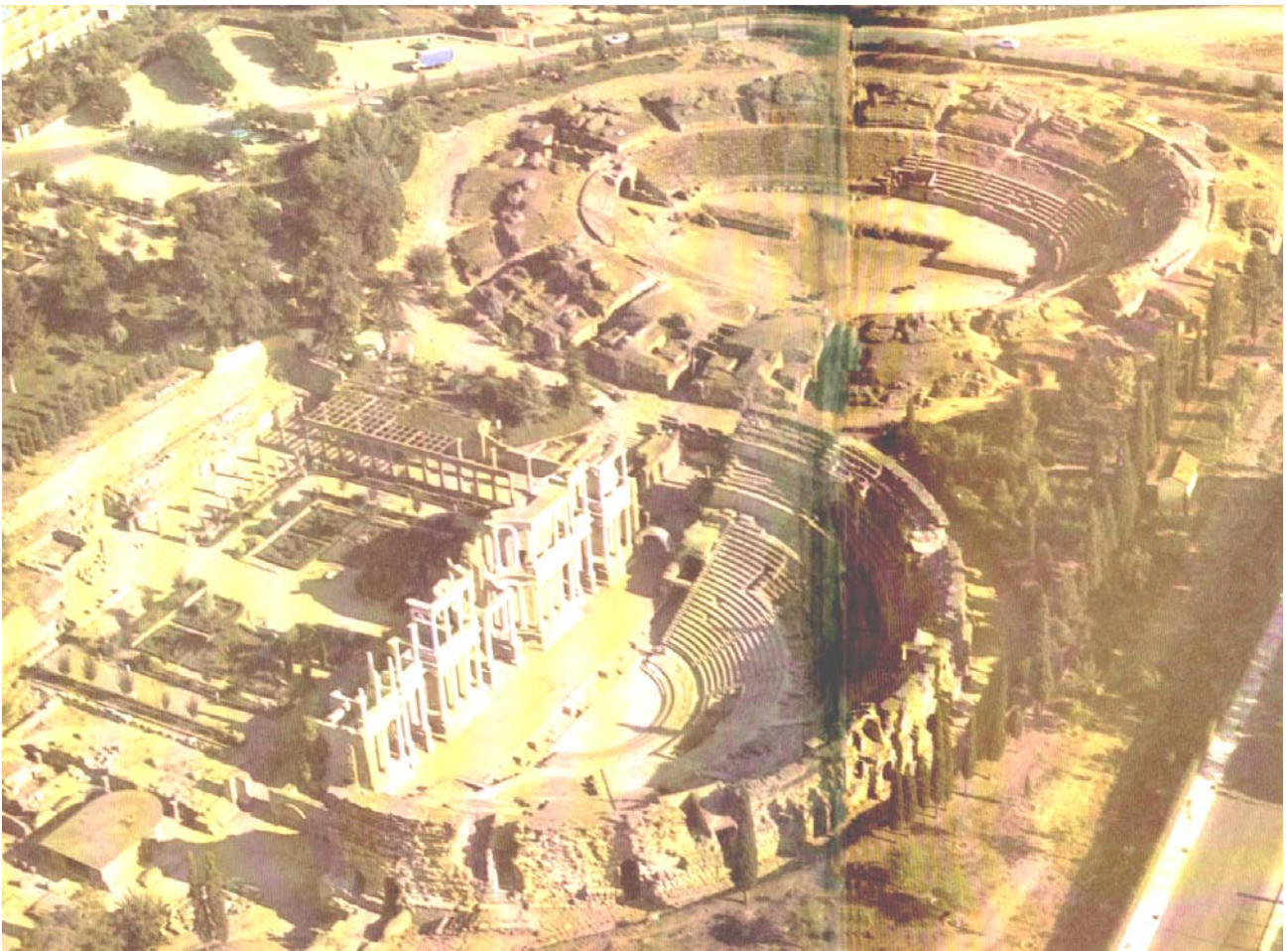
**Microorganismos del agua naciente
y
de las piscinas templadas y frías**

Balneario de Alange



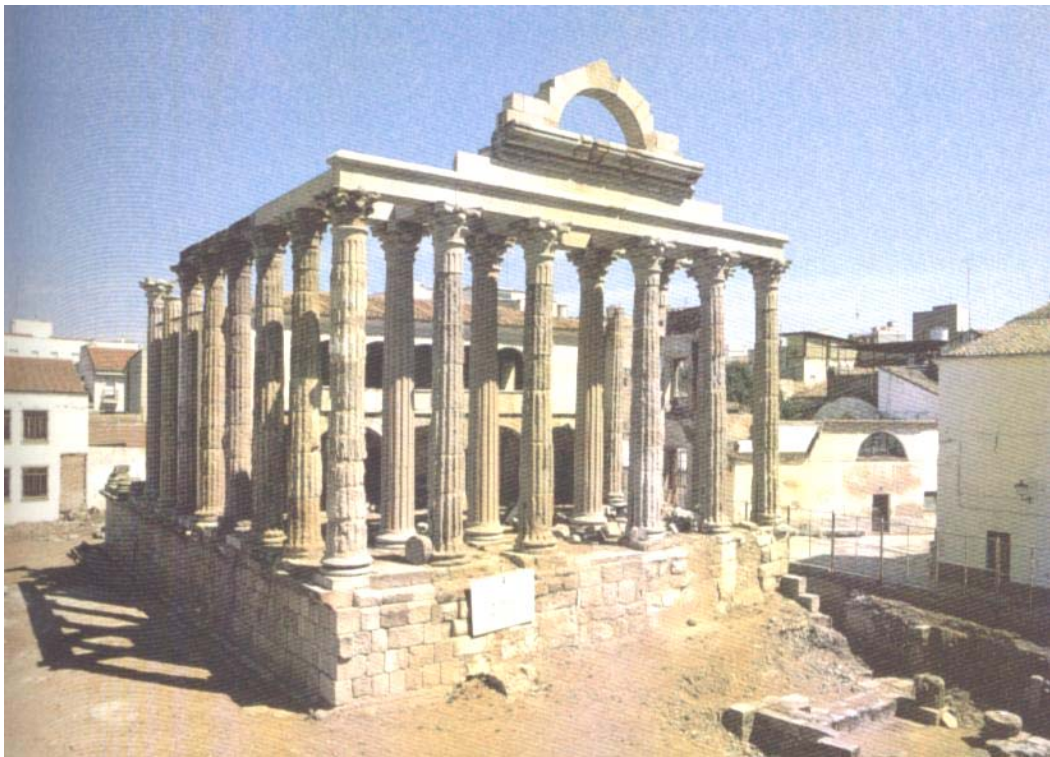
**ICONOGRAFÍA DE
MONUMENTOS ROMANOS DE MÉRIDA
Y
BALNEARIO DE ALANGE**

MÉRIDA



Teatro y Anfiteatro

MÉRIDA



Templo de Diana

MÉRIDA



Arco de Trajano

MÉRIDA



Puente sobre el río Guadiana



Acueducto de Los Milagros

ALANGE



Balneario y vista parcial del pueblo

ALANGE



Balneario, jardines y hotel

BALNEARIO



Monumento Romano

BALNEARIO



Monumento Romano y piscina exterior

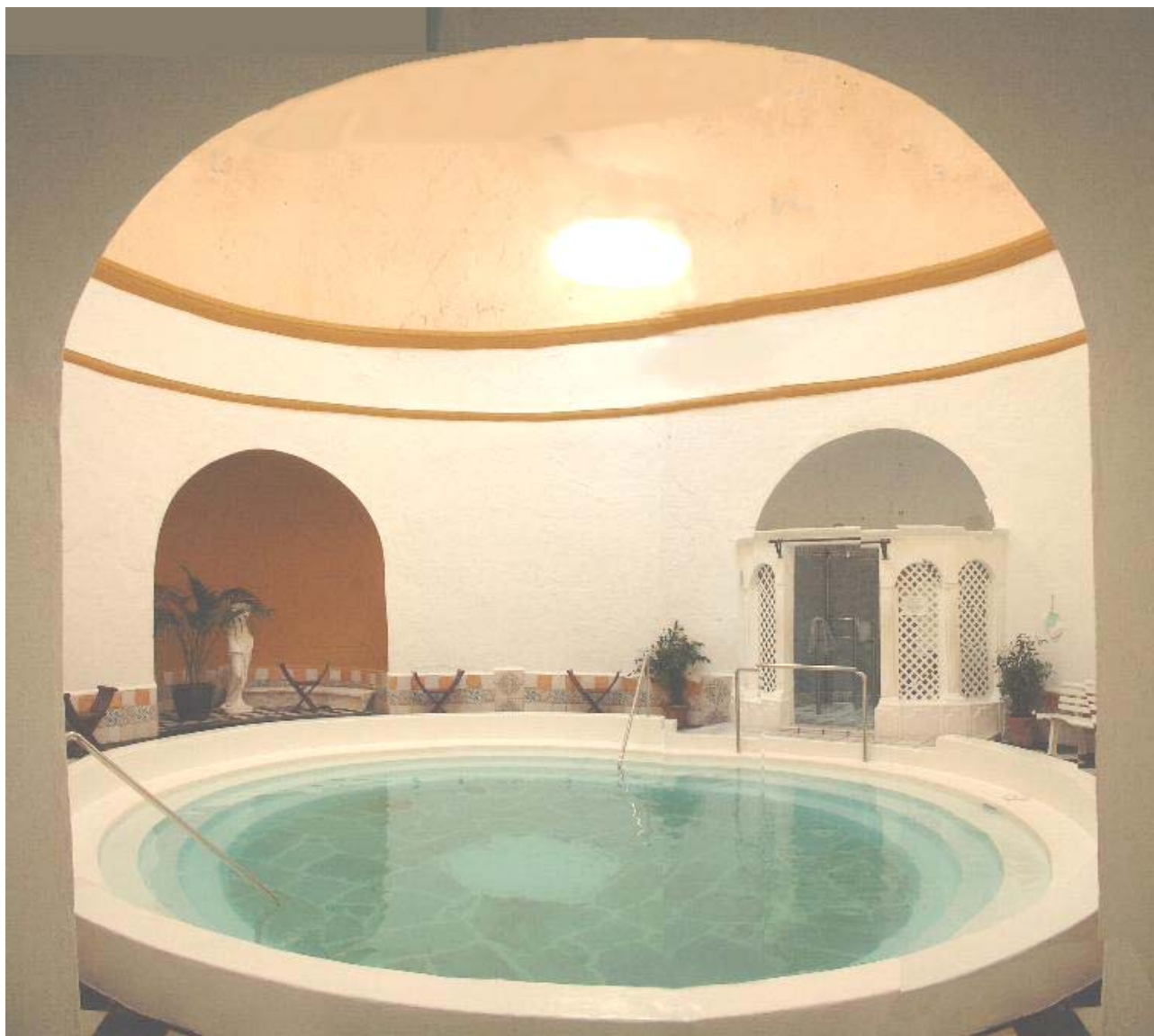


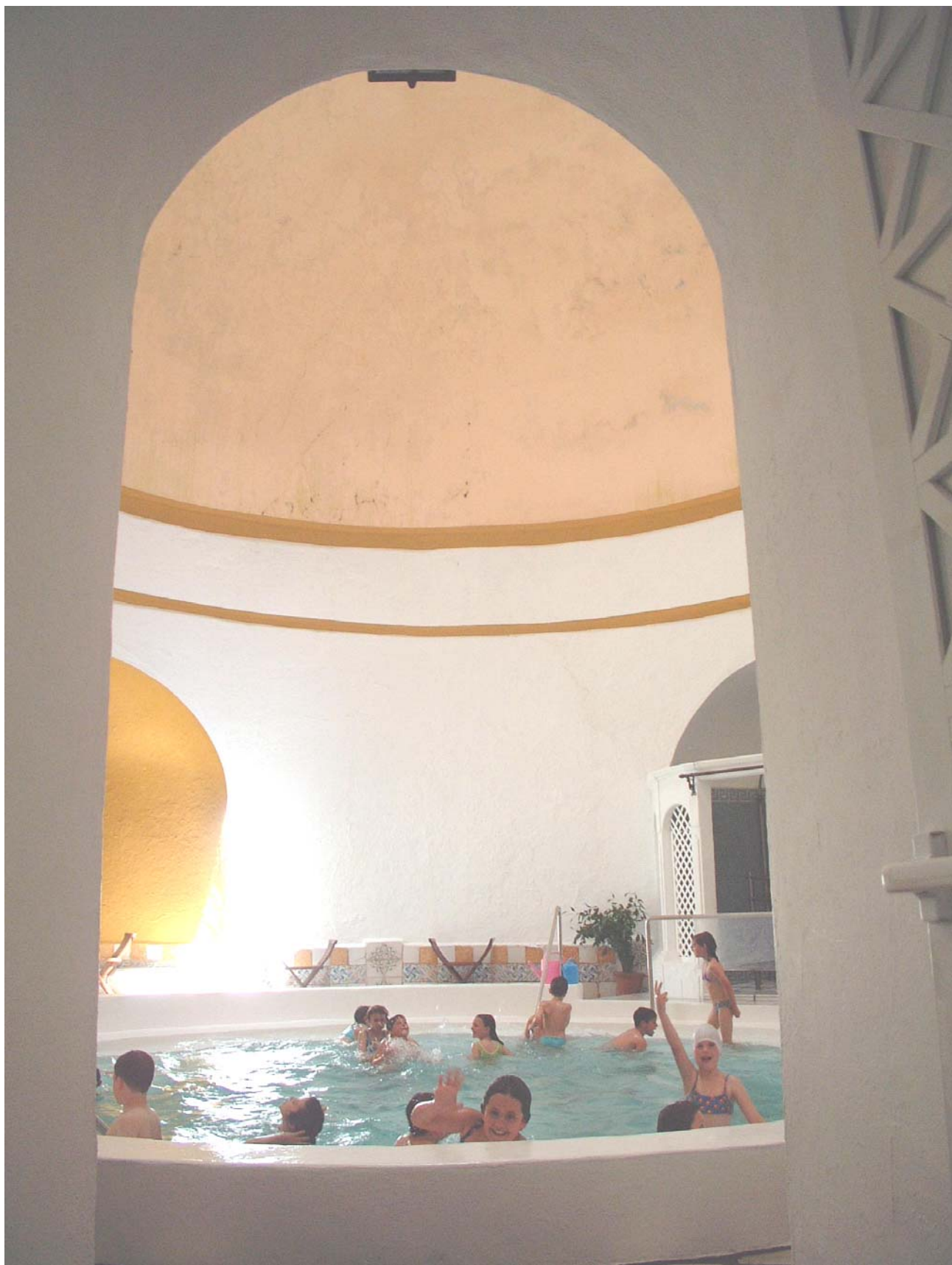
Acceso desde el jardín

ESCALERA ROMANA -Visión descendente -



TERMA ROMANA -1-





Sesión de Baño

TERMA ROMANA -1-

Visión Cenital





Sesión de baño

TERMA ROMANA -2-



ESCALERA ROMANA -Visión ascendente-



Patio Siglo -XIX-



Patio Central S. XIX Cubierto

y

Baños Individuales



Patio Central S. XIX Cubierto





Lápida Votiva Romana e imagen de la diosa Juno



LÁPIDA VOTIVA ROMANA

Patio S. XIX Cubierto

-Acceso a Administración, Consulta Médica y MANANTIAL-



Bañera Individual -Siglo XIX-





LAGUNAS DEL MANANTIAL



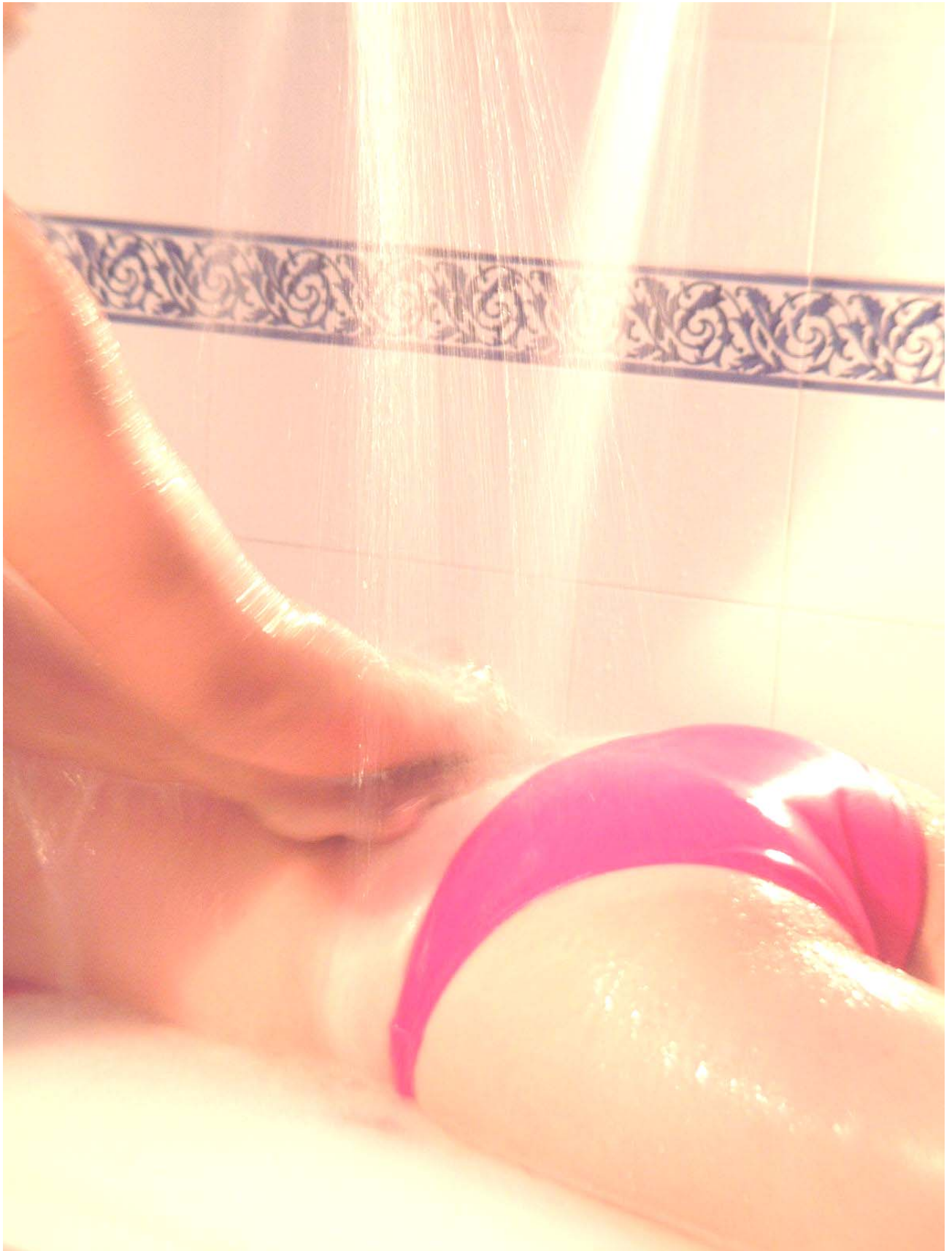
Piscina de Burbujas



Galería de Hidroterapia



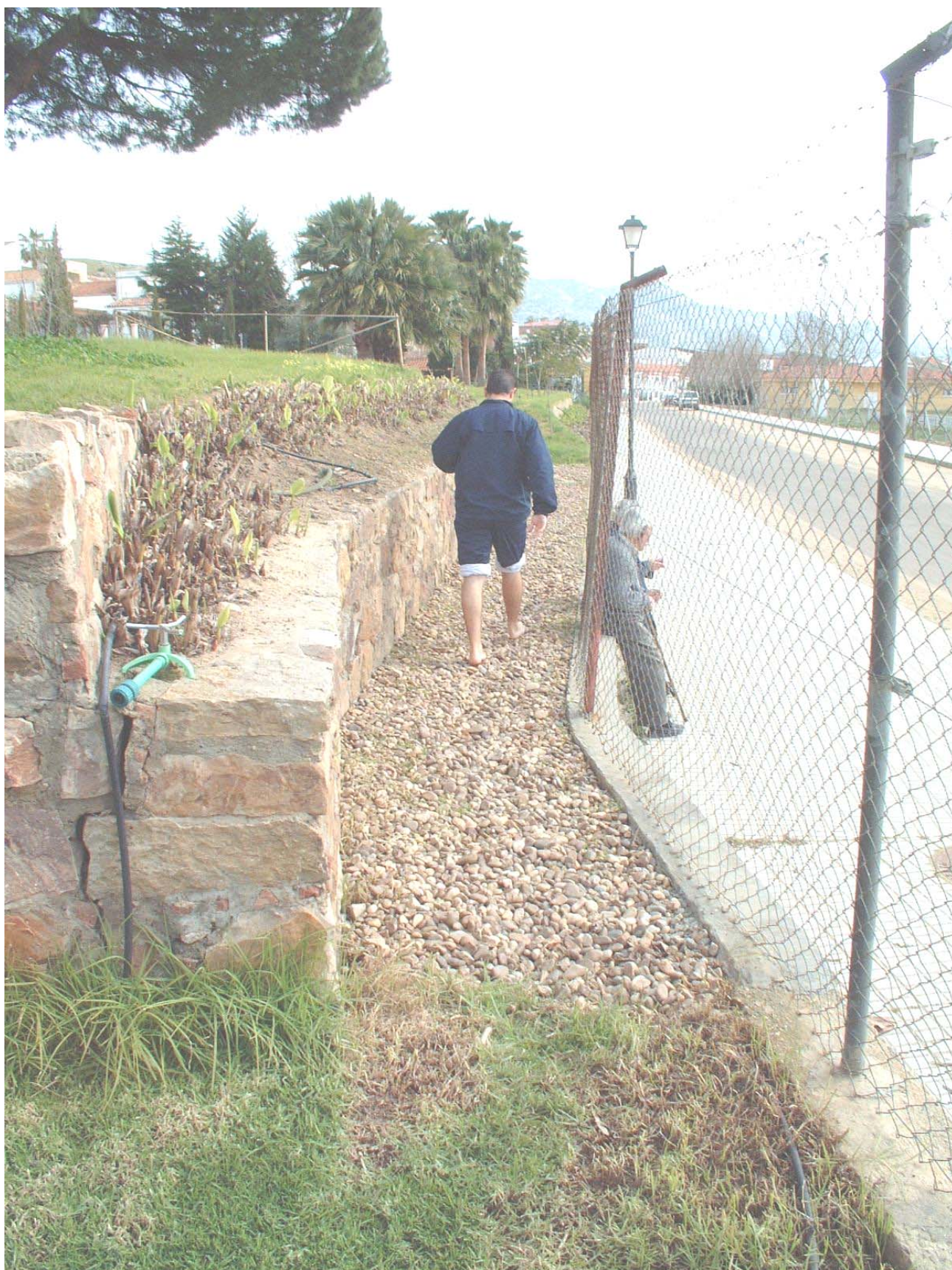
Aplicación de Ducha Escocesa



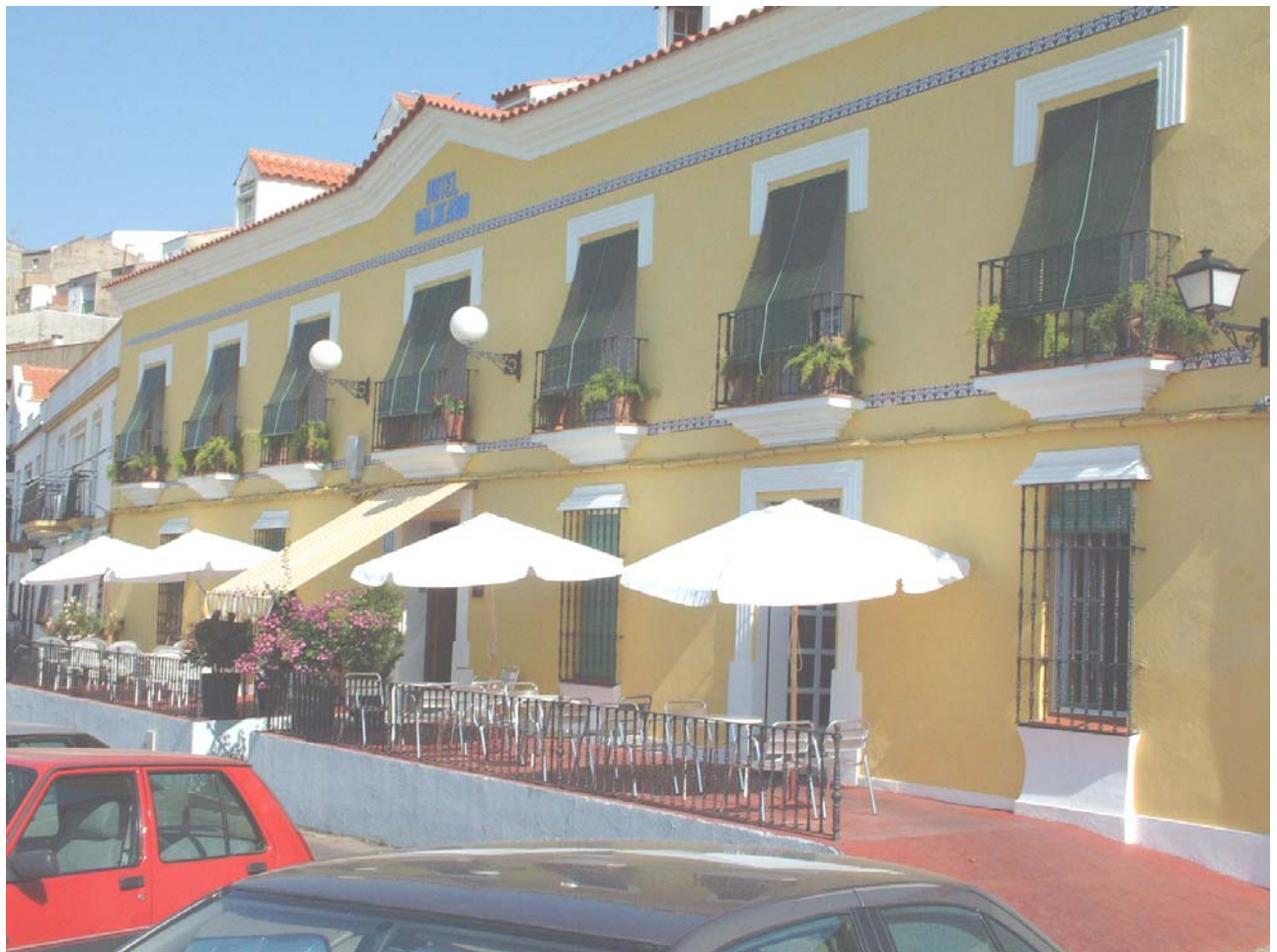
Ducha y Masaje Vichy



Pileta -Cura de Kneipp-



Sendero de Guijarros -Cura de Kneipp-



Fachada Hotel Varinia
Balneario Alange



Patio Hotel Varinia



Salón Hotel Varinia



Vestíbulo Hotel Varinia



Vista parcial -Embalse de Alange-

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Cantero P.A. La Memoria del Agua. Simposio: Usos Urbano-Industriales y Funciones de Salud de las Aguas, coordinado por los Dres. Dña. Josefina San Martín Bacaicoa y D. Leandro del Moral. En Libro del Congreso Ibérico sobre Gestión y Planificación de Aguas, Zaragoza, pág. 65-73, 1998.
- 2 APHA-AWWA-WEF. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20ª edit. Washington, 1998.
- 3 Snow J. On the Mode of Communication of Cholera. London: 1855. Reprinted in Frost WH, ed. Snow on Cholera. New York: commonwealth Fund; 1936. (reseña documentada En Principles and Practice of Infectious Diseases 5th edition, Churchill Livingstone. A. Harcourt Health Sciences Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000).
- 4 Dominguez Carmona M. Epidemiología general de las enfermedades transmisibles. En Medicina Preventiva y Salud Pública 8ª edición, Salvat Editores, 305-319, Barcelona, 1988.
- 5 Romero Martín M., San Martín Bacaicoa J. Aguas de abastecimiento urbano y salud. El agua a debate desde la Universidad. En Libro del Congreso Ibérico sobre Gestión y Planificación de Aguas, Zaragoza, pág. 175-184, 1998.
- 6 Topley W.W.C., Wilson G.S. Medios, desarrollo y muerte de las bacterias. En Bacteriología e Inmunidad. Salvat Editores, 1ª edición española traducida de la 2ª edición inglesa, Barcelona, 1942.
- 7 García Martín M. y otros. Epidemiología analítica del agua: de la cadena de transmisión al factor de riesgo. En Estudio Sanitario del agua, 2ª ed. Edit. Universidad de Granada, pág. 21-32, 1999.
- 8 Directiva Comunitaria 80/777/CEE de 15 de Julio, relativa a la aproximación de la legislación de los Estados miembros sobre explotación y comercialización de las aguas minerales naturales, 1980.
- 9 Organización Mundial de la Salud. Monográfico sobre el Agua. Salud Mundial; Julio-Agosto, 1992.
- 10 Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1. Recomendaciones 2ª edición. OMS, Geneva, 1995.
- 11 Lain Entralgo P. Conocimiento científico de la enfermedad y del tratamiento, <Corpus Hipocraticum>. En: Historia de la Medicina. Editorial Salvat S.A. Barcelona, 1982.
- 12 Muñoz Calvo S. Balnearios o Templos de Salud. Sección Historia de la Medicina. Jano, Vol. XLIII, nº 1017: 101-104, 1992.

- 13 Armijo Valenzuela M. Concepto y evolución de la Hidrología Médica. En Compendio de Hidrología Médica, Editorial Científico-Médica, pag.1-12, Madrid, 1968.
- 14 Ceballos Hernansanz M^a A. Legislación balnearia española. En Curas Balnearias y Climáticas talasoterapia y helioterapia, 1^a edición, Editorial Complutense, pag. 39-48, Madrid, 1994.
- 15 Directiva Comunitaria 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano, 1998.
- 16 Romero Martín M. Microorganismos de las aguas y en particular de las Mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. II, nº 3: 121-125, 1987.
- 17 San Martín Bacaicoa J. Las curas balnearias como agente terapéutico. En Curas Balnearias y Climáticas, talasoterapia y helioterapia. Editorial Complutense, 1^a edición, Madrid, 1994.
- 18 Arévalo J.M., Abecia L.C. Integración de la balneoterapia en la Salud Pública. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XI, nº 3: 119-126, 1996.
- 19 Rodríguez Míguez L. El agua: elemento fundamental. En: Estudio Histórico Bibliográfico del Termalismo: principales surgencias de la provincia de Orense. Editado por la Deputación Provincial de Ourense, 1995.
- 20 Omont A., Berteaux J.L. El agua en el Cosmo. Mundo Científico, Vol. 104, nº 10: 744-750, 1990.
- 21 Peixoto J.P. El ciclo del agua y el clima. Mundo Científico, Vol. 104, nº 10: 728-735, 1990.
- 22 Pentcheva E.N., Van't Dack L., Veldeman E. El equilibrio hidrogeoquímico <<materia en solución-materia en suspensión>> en las aguas termominerales profundas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XI, nº 2: 67-72, 1996.
- 23 Armijo Castro F. Estructura y propiedades físicas, físico-químicas y químicas del agua y de las aguas mineromedicinales. En Curas Balnearias y Climáticas, talasoterapia y helioterapia. Editorial Complutense 1^a edición, Madrid, 1994.
- 24 Nicolaïdis S. La sed. Mundo Científico, Vol. 104 nº 10: 812-818, 1990.
- 25 Armijo Castro F. Estructura del agua líquida: Repercusión en sus propiedades físicas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. I, nº 1: 15-20, 1986.
- 26 Catalán Lafuente J. El agua especie química, su molécula. En Química del agua. Bellisco Librería Editorial, 1^a reimpresión, pag. 32-47, Madrid, 1990.
- 27 Eagland D. La estructura del agua. Mundo Científico, Vol. 104 nº 10: 736-742, 1990.
- 28 Mortimer R.G. Water structure. En Physical Chemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., pag. 175-178, California, 1993.

- 29 Tinoco I. Jr., Sauer K., Wang J.C. Water structure. En Physical Chemistry, principles and applications in biological sciences, Prentice Hall, Upper Saddle River, 3th edition, pag. 461-463, New Jersey, 1995.
- 30 Levine I.N. Agua, estructura del líquido y modos normales. En Fisicoquímica, McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.U., 4ª edición, vol 2: 792-795, Madrid, 1998.
- 31 Sanchez García P. Cura balnearia: Agente terapéutico. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. II, nº 1: 9-14, 1987.
- 32 Boulangé M. Effets généraux de la cure thermale. Presse Therm. Clim. nº 132: 213-216, 1995.
- 33 San Martín Bacaicoa I., Armijo Castro F. Aguas Sulfata Sódica. En: Curas Balnearias y climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Editorial Complutense, 1ª ed., pag: 246-249. Madrid, 1994.
- 34 Armijo Castro F. El azufre en las aguas mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. V, nº 3: 109-112, 1990.
- 35 San José Arango C. Acciones sobre el organismo de las aguas sulfuradas, cloruradas de alta mineralización e hipertermas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IX, nº 2: 79-84, 1994.
- 36 Calligaris R., Ottoboni S. Azione della crenoterapia sulfurea sull'olfatto in rapporto all'attività catalitica e alla tensione superficiale. Med. Clin. E Term. Nº 12: 29-34, 1990.
- 37 Hernández Torres A., Ramón Giménez J.R., Cuenca Giralde E., Márquez Montes J. Modificación de la peroxidación lipídica humana en pacientes normotensos e hipertensos tratados cronoterápicamente con aguas sulfuradas y peloides. Procceding de la V Reunión del Grupo Español de Radicales libres, pag. 11, Granada 1998.
- 38 Hernández Torres A., Ramón Giménez J.R., Cuenca Giralde E., Márquez Montes J. Acción antioxidante en el organismo humano del tratamiento crenoterápico con aguas sulfuradas y peloides en relación con la vía de administración utilizada. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XIII, nº 1: 27-39, 1998.
- 39 Hernandez Torres A., Ramón Giménez J.R., Martel Claros N., Cuenca Giralde E., Marquez Montes J.C. Resultado de la acción crenoterápica con aguas sulfuradas y peloides y otras medidas no farmacológicas sobre la tensión arterial en el balneario. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XV, nº 1: 35-46, 2000.
- 40 Pratzel H.G. Acción de las aguas mineromedicinales. Efectos generales de las aplicaciones tópicas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol II, nº 3, 33-38, 1993.
- 41 Colomer M.A., Ovejero L., Canelas O., Barroso J. Actualidad en el tratamiento de las afecciones dermatológicas en la cura balnearia. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XIII, nº 3: 141-143, 1998.

- 42 Armijo Valenzuela M. Aguas Bicarbonatadas Sódicas. En: Curas Balnearias y Climáticas. Editorial Complutense, 1ª ed., pág: 261-263, Madrid, 1994.
- 43 Armijo Valenzuela M. Aguas Carbogaseosas. En: Curas Balnearias y Climáticas. Editorial Complutense, 1ª ed., pág: 271-278, Madrid, 1994.
- 44 Chappuis P.H. Les Oligoéléments en médecine et biologie. Ed. Masson, Paris, 1991.
- 45 Negretti de Brätter V., Brätter P., Mohn L., Sitzler G. Minerales y Oligoelementos. Editorial Fundación Bertelsman, 1995.
- 46 San Martín Bacaicoa J. Aguas Oligominerales. En: Curas Balnearias y Climáticas. Editorial Complutense, 1ª ed., pág: 305-312, Madrid, 1994.
- 47 Mozotota Sagardía S. Litiasis urinarias y curas hidrominerales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. I, nº 3: 105-107, 1986.
- 48 Fuentes A. Consideraciones sobre algunas aguas de diuresis envasadas españolas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. I, nº 3: 107-110, 1996.
- 49 San Martín Bacaicoa I. Oligoelementos y aguas mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IX, nº 2, 85-92, 1994.
- 50 Losada Villasante M. Oligoelementos en los elementos y moléculas de la vida. En Introducción a la Química biológica y Biología molecular. Editorial Universidad, 1999.
- 51 Pozet N., Hadj Aissa A., Labeeuw M., Capdeville P., Zech P. Le comportement rénal est-il influencé par la composition d'une charge hydrique? Presse Therm. Clim. vol. 131, nº 1: 5, 1994.
- 52 Nappi G., de Luca S., Masciocchi M.M. Revisión del efecto biológico y del poder terapéutico del agua Oligometalica Natural de S. Antonio (Italia). Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XI, nº 2: 83-89, 1996.
- 53 Armijo Valenzuela M. Aguas Radiactivas. En: Curas Balnearias y Climáticas. Editorial Complutense, 1ª ed., pág: 289-302, Madrid, 1994.
- 54 Marín Gorriz F.J. Otra manera de ver la radiactividad de las aguas mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IV, nº 1: 15-20, 1989.
- 55 Soto J. Radiactividad en las aguas mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol V, nº 3: 115-119, 1990.
- 56 Soto Torres J., Fernández P., Quindos L.S. Radioactivity in Spanish spas. Scienc. Total Environ. nº 162 pag. 187-192, 1995.
- 57 Sáinz Fernández C., Soto Torres J. Respuesta adaptativa a las bajas dosis de radiación. Actas XII Congreso de la SEFM, pag. 1-5, 1999.
- 58 Soto J., Noriega M.J. Potencial de membrana de células nerviosas y Rn-222 en balnearios. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XI, nº 3: 147-152, 1996.

- 59 Soto J., Gómez J. Efectos Horméticos en balnearios radiactivos. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. X, nº 3: 187-192, 1995.
- 60 Armijo Valenzuela M. La cura balnearia en el tratamiento de procesos neuróticos e infraneuróticos. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. II, nº 1: 29-34, 1988.
- 61 San Martín Bacaicoa J. Reumatismos psicógenos y curas balnearias. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. III, nº 1: 35-41, 1988.
- 62 Surribas C., Torán M.A., Bonamussa R.M. La ansiedad, su diagnóstico y tratamiento en el balneario. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IV, nº 2: 77-80, 1989.
- 63 Brock, Biología de los Microorganismos -Madigan y otros-, 8ª Edic. Prentice Hall Iberia, Madrid, 1999.
- 64 Stanier R.Y., Ingraham J.L. Relaciones entre estructura y función en las células procariotas. En Microbiología. Editorial Reverté, 2ª Edic. pag., 155-194, Barcelona, 1996.
- 65 Falkow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. Cell., nº 65: 1099-1102, 1991.
- 66 König H. Archaeobacterial cell envelopes. Can. J. Microbiol. Nº 34: 395-406, 1988.
- 67 Pelmont J. Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Preese Universitaires de Grenoble, 1993.
- 68 Doyle R.J. Cell walls of bacteria. In Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Inc. pag. 479-493, 1992.
- 69 Stainer R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L., Painter P.R. Crecimiento microbiano, su medición y efectos del medio. En Microbiología 2ª edición, Editorial Reverté S.A., 5ª edición de la original -The Microbial World- 1996.
- 70 Davis B.D. Crecimiento y muerte de las bacterias. En Tratado de Microbiología, Davis y Dulbecco, 4ª edición, Editorial Masson, S.A., pp. 47-60, 1996.
- 71 Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. Ecología microbiana. En Brock Biología de los microorganismos. 8ª edición, Editorial Prentice Hall, pp. 532-605, 1998.
- 72 Atlas R.M., Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Education S.A. Madrid, 2002.
- 73 Grant W.D., Long P.E. Ambientes extremos. En: Microbiología ambiental. Editorial Acribia, S.A., pag. 53-68, Zaragoza, 1989.
- 74 Schoenheit P., Schaefer T. Metabolism of hyperthermophiles. World Journal of Microbiology & Biotechnology nº 11: 26-57, 1995.
- 75 Stetter K.O. Microbial life in hyperthermal environments. ASM News, nº 61:285-290, 1995.

- 76 Moyer C.L., Morita R.Y. Effect of growth rate and starvation-survival on the viability and stability of a psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, nº 55: 1122-1127, 1989.
- 77 Wynn-Williams D.D. Ecological aspects of Antarctic microbiology. *Advances in Microbial Ecology*, nº 11: 71-146, 1990.
- 78 Mann S., Sparks N.H.C., Frankel R.B. et al. Biomineralization of ferromagnetic greigite (FeS₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetostatic bacterium. *Nature* nº 343: 258-261, 1990.
- 79 Reinheimer G. *Aquatic Microbiology* 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992.
- 80 Oliveira D.R. Physico-chemical aspects of adhesion. *In* *Biofilms, science and technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pag. 45-58, 1992.
- 81 Ofek I., Doyle R.J. *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Chapman & Hall. New York, 1994.
- 82 Maraver Eyzaguirre F., Crespo Ferrer V., Sanchez Quevedo M.C., Campos Muñoz A., San Martín Bacaiocoa J. Microscopía electrónica analítica del material orgánico de las aguas sulfuradas. *Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd.*, Vol. II, nº 3: 133-135, 1987.
- 83 Parameswaran A.K., Provan C.N., Sturm F.J., Kelly R.M. Sulfur reduction by the extremely thermophilic archaeobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, nº 53: 1690-1693, 1987.
- 84 Fauque G., Legall J., Barton L.L. Sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria. *In* *Variations in autotrophic life*, Shively J.M., Barton L.L. Academic Press, pag. 271-337, 1991.
- 85 Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica*. Editorial Médica Panamericana S.A., 5ª edic. Madrid, 2002.
- 86 Kloos W.E., Schleifer K.H., Götz F. The genus *Staphylococcus*. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M. *The prokaryotes*, second edition. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification applications. Springer-Verlag, New York Inc., pag. 1369-1420, 1992.
- 87 Prieto Prieto J., Gómez-Lus Centelles M^a L. Genero *Staphylococcus*. *En* *Microbiología Médica*, García-Rguez. J.A., Picazo J. Editorial Mosby, pp. 179-191, 1996.
- 88 Kluytmans J., Van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, nº 10: 505-520, 1997.
- 89 Martin R.R., Buttram V., Bosch P., et al. Nasal and vaginal *Staphylococcus aureus* in young women: Quantitative studies. *Ann Intern Med.* nº 96:951, 1982.

- 90 Melish M.E., Glasgow L.A. The staphylococcal scalded skin syndrome: Development of an experimental model. N. Engl. J. Med. nº 282: 1114, 1970.
- 91 Takagi Y., Futamura S., Asada Y. Action site of exfoliative toxin on keratinocytes. J Invest Dermatol. nº 94: 52, 1990.
- 92 Gemmell C.G. Staphylococcal scalded skin syndrome. J. Med. Microbiol., nº 43: 318-327, 1995.
- 93 Schlievert P.M., Shands K.N., Dan B.B. et al. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. J Infect Dis. nº 143 : 509, 1981.
- 94 Garbe P.L., Arka R.J., Reingold A.L. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from patients with nonmenstrual toxic shock syndrome. JAMA. nº 253: 2538-2542, 1985.
- 95 Schlievert P.M. Comparison of cotton and cotton/rayon tampons for effect on production of toxic Shock syndrome toxin. J Infect Dis. nº 172: 1112-1114, 1995.
- 96 Bryant R.E., Salmon C.J. Pleural empyema. Clin Infect Dis. nº 22: 747-762, 1996.
- 97 Patel S.R., Olenginski T.P. Perruquet J.L. et al. Pyomyositis: Clinical features and predisposing conditions. J Rheumatol. nº 24: 1734-1738, 1997.
- 98 Bettelheim K.A. The genus *Escherichia*. In: Balows A., Trüper HG., Dworkin M. The prokaryotes, second edition. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification applications. Springer-Verlag, New York Inc., pag. 2696-2736, 1992.
- 99 Prats G., Mirelis B. Enterobacterias. Características generales *Escherichia coli*. En Microbiología Médica, García-Rguez J.A., Picazo J. Editorial Mosby, pp. 223-237, 1996.
- 100 Lugtenberg B., van Alphen L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta, nº 737: 51-115, 1983.
- 101 Krogfelt K.A. Bacterial adhesion: Genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*, Rev. Infect. Dis. nº 13: 721-735, 1991.
- 102 Rubinoff M.J., Field M. Infectious diarrhea. Annu Rev Med. pag 403-410, 1991.
- 103 Okhuysen P.C., Ericsson C.D. Travelers' diarrhea: Prevention and treatment. Med. Clin. North. Am. nº 76: 1357-1373, 1992.
- 104 Leclerk H. Les *Escherichia coli* responsables de diarrhée. Arch. Fr. Pediatr., nº 50: 57-67, 1993.
- 105 Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. nº 11: 142-201, 1998.

- 106 Johnson J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin. Microbiol. Rev. nº 4: 80-128, 1991.
- 107 Connell I., Agace W., Klemm P. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA nº 93: 9827-9832, 1996.
- 108 Gupta R., Gupta S., Ganguly N.K. Role of type I fimbriae in the pathogenesis of chronic pyelonephritis in relation to reactive oxygen species. J. Med. Microbiol. nº 46: 403-406, 1997.
- 109 Kline M.W., Mason E.D., Kaplan S.L. Characterization of *Citrobacter diversus* strain causing neonatal meningitis. J. Infect. Dis., nº153: 101-105, 1988.
- 110 Gilardi G.I. Pseudomonas and related genera. In Balows A. Hausler W.J. Jr.. Manual of Clinical microbiology. Washington D.C. ASM Press. 5ª Ed. 429-441, 1991.
- 111 Gómez-Lus R. Pseudomonas y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. En Microbiología Médica, García-Rguez J.A., Picazo J. Editorial Mosby, pág. 292-306, 1996.
- 112 Van Asperen I.A., de Rover C.M., Schijven J.F. Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. Br. J. Med. nº 311: 1407-1410, 1995.
- 113 Palleroni N.J. Human -and animal- pathogenic pseudomonads. In Balows A., Trüper HG., Dworkin M. The prokaryotes, second edition. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification applications. Springer-Verlag, New York Inc., pág. 3086-3103, 1992.
- 114 Gilligan P.H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., nº 4: 35-51, 1991.
- 115 Moss R.B. Cystic fibrosis: pathogenesis, pulmonary infection, and treatment. Clin. Infect. Dis., nº 21: 839-851, 1995.
- 116 Deretic V., Schurr M.J., Yu H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. Trends in Microbiology, nº 3: 351-356, 1995.
- 117 Thomas P., Moore M., Bell E. *Pseudomonas* dermatitis associated with a swimming pool. JAMA, nº 253: 1156-1159, 1985.
- 118 Tredget E.E., Shankowsky H.A., Joffe A.M. Epidemiology of infections with *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients: The role of hydrotherapy. Clin. Infect. Dis. nº 15: 941-949, 1992.
- 119 Tabor E., Gerety R.J. Five cases of pseudomonas sepsis transmitted by blood transfusions. Lancet I: 1403, 1984.
- 120 Brewer S.C., Wunderink R.G., Jones C.B., Leeper K.V. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest. nº 109: 1019-1029, 1996.

- 121 Nagaki M., Shimura S., Tanno Y. Role of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in the development of bronchiectasis. *Chest*. nº 102: 1464-1469, 1992.
- 122 Fang G.D., Yu V.L., Vickers R. M. Disease due to the Legionellaceae (other than *Legionella pneumophila*): Historial, microbiological, clinical and epidemiological review. *Medicine*. nº 68: 116-132, 1989.
- 123 Tison D.L., Pope D.H., Cherry W.B. Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* nº 39: 346-459, 1980.
- 124 Rowbothan T.J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* nº 36: 978-986, 1983.
- 125 Kuroki T., Yagita K., Yabuuchi E., Agata K., Ishima T., Katsube Y., Endo T. Isolation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae at hot spring spas in Kanagawa, Japan. *Kansenshogaku Zasshi*, Vol. 72, nº 10: 1050-1055, 1998. (artículo en japonés, consultado el abstract).
- 126 Kuroki T., Sata S., Yamai S., Yagita K., Katsube Y., Endo T. Occurrence of free-living amoebae and *Legionella pneumophila* in whirlpool bathes. *Kansenshogaku Zasshi*, Vol. 72, nº 10: 1056-1063, 1998. (artículo en japonés, consultado el abstract).
- 127 Stout J.E., Yu W.L., Best M. Ecology of *L. pneumophila* within water distribution systems. *Appl. Environ. Microbio.*, nº 49: 221-228, 1985.
- 128 Murder R., Yu V.L., Woo A. Mode of transmission of *L. pneumophila*: A critical review. *Arch Intern Med.* nº 146:1607-1612, 1986.
- 129 Benenson A.S. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organización Panamericana de la Salud 15ª edic., 1992.
- 130 Bellinger-Kawara C., Horwitz M.A. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *L. pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MIMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* nº 172: 1201-1210, 1990.
- 131 Cianciotto N. P., Bangsberg J. M. Eisenstein B. I. et al. Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infect. Immun.* nº58(9): 2912-2918, 1990.
- 132 Stout J.E., Yu W.L. Current concepts: Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* nº 337: 682-697, 1997.
- 133 Sáenz González M.C., Rodrigo Sánchez N. Legionelosis. En: Medicina Preventiva y Salud Pública G. Piédrola Gil, 9ª edi. Masson-Salvat, Barcelona, 1991.
- 134 Granados Pérez R., Villaverde Peris M.C. Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. En: Microbiología. Editorial Paraninfo, pág. 38-48, 85-110, Madrid, 1998.

- 135 Rodier J. Análisis bacteriológico y Metodos instrumentales en hidrología. En Análisis de las aguas: aguas naturales, residuales y de mar. 3ª Reimpresión, Ediciones Omega S.A., Barcelona, pág. 663-672 y 909-947, 1998.
- 136 Armijo Valenzuela M. Clasificación de las aguas mineromedicinales. En: Compendio de Hidrología Médica. Ed. Científico Médica, Barcelona, 1968.
- 137 Arias L., Armijo M., San Martín J. Concepto de Termalidad y Aguas Mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med. Vol II, nº 2: 93-100, 1995.
- 138 Espigares García M., Mariscal Larrubia A., Jurado Chacón D. Servicios de abastecimiento de aguas de consumo. En : Medicina Preventiva y Salud Pública, Piédrola Gil y otros. Editorial Masson, edic. 10ª 311-319, Madrid, 2001.
- 139 Aragón V., Bengoechea J.A. Diluciones seriadas para el recuento de microorganismos, En: Manual Práctico de Microbiología, Díaz R. y otros. ed: Masson, pág 55-58, 1999.
- 140 Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Microbiología, Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana, edic. 4ª, 1999.
- 141 Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. (h.) Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, 2001.
- 142 Bengoechea J.A., Aragón V. Técnicas Turbidimétricas. En: Manual práctico de Microbiología. Díaz R. y otros. Editorial Masson, pág 51-54, 1999.
- 143 Humble M.W., King A., Phillips I. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. J. Clin. Pathol., nº 30: 275-277, 1977.
- 144 Von Graevenitz A., Zollinger J. Evaluation of pertinent parameters of a new identification system for non-enteric gram-negative rods. Eur. J. Clin. Microbiol. Nº 10: 175-179, 1979.
- 145 Kloos W.E., Wolfshohl J.F. Identification of *Staphylococcus* species with the API Staph-IDENT system. J. Clin. Microbiol., nº 16: 509-516, 1982.
- 146 Díaz R., Gamazo C., López Goñi I. Técnicas de recuento de bacterias. En: Manual práctico de Microbiología. Editorial Masson S.A., 2ª Edic. pág., 51-58, Barcelona, 1999.
- 147 Gómez-Lus M.L., Aguilar L., Martín M., Giménez M.J., Martínez P., Prieto J. Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype-9 strain of *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes in the presence of subinhibitory concentrations of clavulanic acid. J. Antimicrob. Chemother, nº 40(1): 142-144, 1997.
- 148 Koneman E.W., Allen D.S., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Washington C.W.(h). Introducción a la Microbiología: Parte II: Indicaciones para la recolección, transporte, procesamiento, análisis e informe de cultivos obtenidos a partir de muestras de fuentes específicas. En Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana, pág. 121-163, 2001.

- 149 Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F., Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. Appl. Environ. Microbiol., nº 50: 1125-1128, 1985.
- 150 Martinelli F., Carasi S. Detection of *Legionella pneumophila* at thermal spas. New Microbiol., nº 24(3): 259-264, 2001.
- 151 Martín Sánchez A.M. Protozoos de interés médico. En Microbiología Médica, García-Rguez J.A., Picazo J. Editorial Mosby, pág. 767-783, 1996.
- 152 Wever P.C., Yzerman P.F. Rapid diagnosis of Legionnaires disease using an inmunocromatographic assay for *Legionella pneumophila* SG1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. J. clin.Microbiol., nº 38 : 2738-2739, 2000.
- 153 SPSS. *SPSS 11.5 Syntax Reference Guide*. SPSS Inc 2002.
- 154 Armijo Castro F., San Martín Bacaicoa J. Conductividad eléctrica de las aguas mineromedicinales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IX, nº 3: 157-162, 1994.
- 155 Armijo Castro F. El pH de las aguas minerales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. II, nº 1: 17-22, 1987.
- 156 Soto J., Fernández P.L., Quindos L.S. Delgado M.T. Radón 222 en Balnearios. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. VI, nº 2: 101-104, 1991.
- 157 Soto J., Fernández P.L., Gómez L.S., Delgado M.T. Radón en el agua en una región de alto nivel de radiación natural. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. VII, nº 2: 85-88, 1992.
- 158 Soto J., Fernández P.L., Gómez J. Radioactivity in spanish spas. Sciec. Total Envirom. Nº 162: 187-192, 1995.
- 159 Vega Fernández de la J. Geografía, prehistoria e historia de Alange. En: Alange, Salud y Arte. Gráficas Sol, 2ª Edic. Badajoz, 1996.
- 160 Web/municipios/alange/patrimonio.htm. Patrimonio e historia de Alange.
- 161 Enciclopedia Universal Ilustrada Europeo-Americana, entrada: “Mérida” apartado de Historia. Editorial Espasa-Calpe, tomo XXXIV, Madrid, 1991.
- 162 Vega Fernández de la J. Historia y testimonios del Balneario de Alange. En Balnearios y fuentes mineromedicinales de Extremadura. Gráficas Sol, pág. 91-96, 103-105, Badajoz, 1987.
- 163 Manuel Roldán J., Santos Yanguas J. Edificios Públicos, Templos y Edificios para Espectáculos. En Historia de España Vol. II, Hispania Romana pág. 275-279, Editorial Espasa-Calpe, Madrid 1997.
- 164 Álvarez Martínez J.Mª, de la Barrera Antón J.L., Velásquez Jiménez A. Los Baños Romanos de Alange. En Mérida pág. 72-75, Editorial Everest, León, 2000.

- 165 Villaescusa y Gaza J. de. Memoria de las aguas y baños minerales de Alange. Establecimiento Lip.-Tip. De Saavedra y Compañía, Madrid 1850.
- 166 Berbén Blanco A. Aguas Bicarbonatadas Cállicas de Alange, IMP, LIT y ENC de Leonardo Miñón e hijos, Madrid 1895.
- 167 Romero Martín M., Serrano Moreno C. Balneario de Alange (Castrum Colubri). Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. III, nº1: 39-41, 1988.
- 168 Gallo P. La Terma Romana. En: Terme e bagni in Pompei antica. Presso Tip. F. Sicignano, pág. 9-16, Pompei, 1991.
- 169 Carmona Barrero J.D. Análisis del desarrollo histórico-arquitectónico de Alange y sus Baños Romanos. En: AQVAE, Gráficas Suroeste, Edit. Caja Rural de Almendralejo-Balneario de Alange S.A., 1999.
- 170 Pratzel H., Balneario: Puesta en forma mental y física (Spa: Mental and physical fitness) 1ª Mesa Redonda del Congreso Internacional de la Sociedad Española de Hidrología Médica Arnedillo 1996. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XII, nº 1: 35-37, 1997.
- 171 Armijo Valenzuela M. Estrés y kneippterapia. An. R. Ac. de Medicina, Tomo CVII, 413-426, 1990.
- 172 Valdés M., Flores T de. Activación y rendimientos. En: Psicobiología del estrés, editorial Martinez Roca, pág 52-54, Barcelona, 1990.
- 173 Surribas C., Torán M.A., Bonamussa R.M. La ansiedad su diagnóstico y tratamiento en el medio balneario. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IV, nº 2: 77-82, 1989.
- 174 Rojas E. La ansiedad. Editorial Temas de Hoy, Madrid, 1994.
- 175 San Martín Bacaicoa J. Influencia psicoterapéutica del médico en las curas balnearias. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XI, nº 3: 26-35, 1996.
- 176 Wachsman F. Las dosis pequeñas ¿son peligrosas en realidad?. Electro-Med, Vol. 55, nº 3: 87-91, 1987.
- 177 Sáinz Fernández C., Cos Corral S., González-Lamuño D., Soto Torres J. Algunas experiencias sobre efectos del radón en células tumorales. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XVII, nº 2: 91-97, 2002.
- 178 Soto Torres J. Efectos biológicos de bajas dosis de radiación en balnearios. Bol. Soc. Esp. Hidrol. Méd., Vol. XVIII, nº1: 17-26, 2003.
- 179 Romero Martín M., Serrano Moreno C. La cura de Kneipp en Balneoterpia para la atención de la salud mental e integral. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XII, nº 2: 107-114, 1997.
- 180 Rojas Montes E., Armijo Valenzuela M. La cura balnearia en los síndromes asténicos. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. VIII nº 2: 67-72, 1993.

- 181 Brown M.R.W., Williams P. The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu. Rev. Microbiol.*, nº 39: 527-556, 1985.
- 182 Roszak D.B., Colwell R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, nº 36: 365-379, 1987.
- 183 Mekalanos J.J. Environmental signals controlling the expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol.*, nº 174: 1-7, 1992.
- 184 Hurme R., Rhen M. Temperature sensing in bacterial gene regulation-what it all boils down to. *Mol Microbiol.*, nº 30: 1-6, 1998.
- 185 Speziale P., Raucci G., Viasi L. Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* cowan 1. *J Bacteriol.*, nº 167: 77-80, 1986.
- 186 Novick R. P. *Estafilococos*. En: Tratado de Microbiología, Davis B. D., Dulbecco R. Editorial Masson 4ª ed. pág: 519-529, Barcelona, 1996.
- 187 Eiseberg H. Life in unusual environments: Progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch. of Bioch. And Bioph.*, nº 318: 1-5, 1995.
- 188 Vivar Gómez M.C. Microbiología de manantiales españoles de aguas mineromedicinales termales. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1997.
- 189 Lee C.Y., Iandolo J.J. Lysogenic conversion of Staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L 54 a genome into the lipase structural gene. *J. Bacteriol.*, nº 166: 385-387, 1986.
- 190 Adams M.W.W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Annual Review of Microbiology* nº 47: 627-658, 1993.
- 191 San José Rodríguez J.C. Aspectos higiénicos de las piscinas termales de reeducación. *Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd.*, Vol. III, nº 2, 1988.
- 192 San Martín Bacaicoa J. Piscinas de tratamiento: higiene y control. En: Jornadas de aguas minerales y mineromedicinales. Instituto Geominero, Colección: Temas Geológico-Mineros, 1992.
- 193 Vendrell M.C., Torres M., Gil P., Vivas J., Rodríguez L.A. Supervivencia de *Enterococcus* en aguas con distinta composición mineral. *Alimentaria* Vol. 306, pág. 19-21, 1999.
- 194 Vendrell M.C., Gallardo C.S., González J.A., Gallego A.R., Rodríguez L.A. Evaluación de la supervivencia del indicador fecal *Escherichia coli* en distintas aguas mineromedicinales. *Alimentaria*. nº 312, pág. 19-22, 2000.
- 195 Richard H.T., Foster J.W. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.*, nº 52: 167-186, 2003.

- 196 Robertis (h.) E. de, Hib J., Ponzio R. Componentes químicos de la célula, enzimas. En: Biología celular y molecular. Editorial Librería El Ateneo, 12ª Edic. pág. 38-41, Buenos Aires 1997.
- 197 Núñez de Castro I. Enzimas y control del metabolismo. En: Enzimología. Ediciones Pirámide (grupo Anaya S.A.), Madrid, 2001.
- 198 Leroy F., Foulquie M.R., de Vuyst L. Enterococcus faecium RZS C5, an interesting bacteriocin enzyme producer to be used as a co-culture in food fermentation. Int. J. Food. Microbiol. nº 88(2-3): 235-240, 2003.
- 199 Griffin D.M. Water and microbial stress. Advances in Microbial Ecology, nº 5: 91-136, 1981.
- 200 Moore J.E., Heaney N. Incidence of Pseudomona aeruginosa in recreational and hydrotherapy pools. Commun. Dis. Public. Health nº 5(1): 23-26, 2002.
- 201 Yarb T.L., Goranson J., Frank D.W. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. Mol. Microbiol.,
- 202 Kinniment S.L., Wimpenny J.W.T. Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across. *Pseudomona aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol., nº 58: 1629-1635, 1992.
- 203 Cárdenas Franco F. Búsqueda selección y caracterización de nuevas lipasas de origen microbiano. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1999.
- 204 Castro Álvarez de S. Nuevos microorganismos productores de Lipasas de utilidad en biotransformaciones. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.
- 205 Denyer S.P., Gorman S.P., Sussman M. Microbial biofilms: formation and control. Blackwell Scientific Publications, London, 1993.
- 206 Gristina A.J. Biofilms and chronic bacterial infections. Clin. Microbiol. Newsl., nº 15: 171-176, 1994.
- 207 Jernigan D.B., Hofmann J. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. Lancet nº 347(9000): 494-499, 1996.
- 208 Picazo J.J., Bouzá E. Legionelosis. En: Infección. Editorial Servisistem. Bilbao, 2002.
- 209 Blatt S.P., Parkinson M.D., Pace E., Hoffman O., Doland D., Lauderdale P., Zajac R.A., Melcher G.P. Nosocomial legionnaires' disease: aspirations as a primary mode of disease acquisition. AM. J.Med., nº 95: 16-22, 1993.
- 210 Romero Martín M., Serrano Moreno C., San Martín Bacaicoa J. Epidemiología de la Legionelosis y consideraciones sobre su prevención en Balnearios. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XVII, nº 2: 67-89, 2002.

- 211 Mosso M.A., de la Rosa M.C. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales de Alange. En: Estudios sobre el Balneario de Alange (Memoria nº 16) López de Azcona J.M. y otros. Instituto de España, Real Academia de Farmacia, pág. 27-40, Madrid, 1990.
- 212 Soto Torres J., Quindos Poncela L.S., Cos Corral S., Sánchez Barceló E. Estudio *in vitro* de los efectos del ^{222}Rn en dosis balneoterápicas sobre células tumorales humanas. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. IX, nº 3: 133-137, 1994.
- 213 Daly M.J., Minton K.W. Resistance to radiation. Science nº 270: 1318-1321, 1995.
- 214 Vendrell M.C., Gallardo C.S., Torres M., Míguez L.R., Araujo P., Rodríguez L.A. Estudio de supervivencia de distintos patógenos en agua termal y agua de río. Bol. Soc. Esp. Hidr. Méd., Vol. XIV, nº 2: 71-81, 1999.
- 215 Vendrell M.C., Garcia Alvarez F.J., Sieiro Gallardo C.M., Rodríguez Míguez L., Rodríguez Lopez L.A. Estudio microbiológico de la supervivencia y estado activo no cultivable de especies de la flora Vibrionacea. Bol. Soc. Esp. Hidrol. Méd., Vol XVII, nº 1: 35-41, 2002.
- 216 Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol., nº 49: 711-745, 1995.
- 217 Wiliam A., Petri (h.) y Barbara J. M. Biopelículas microbianas. En Principios básicos en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas. Mandell, Bennet, Dolin. Editorial Médica Panamericana, Vol. 1, pág. 23-24, 2002.
- 218 O'Toole R., Williams H.D. Universal stress proteins and Mycobacterium tuberculosis. Res. Microbiol., nº 154(6): 387-392, 2003.
- 219 Kvint K., Nachin L., Díez A., Nystrom T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. Curr. Opin. Microbiol., nº 6(2): 140-145, 2003.
- 220 Gerbaud L., Serre A.F., Chevallier C., Fauquert J.L., Riguidel P., Vidal A. Exposition aux légionelles et sérologie légionelle du personnel thermal. Press. Therm. Clim. Vol. 132, nº 2: 86-88, 1995.
- 221 Dominguez J., Galí N., Matas L., Pedroso P., Hernández A., Padilla E. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Legionella* antigen in urine sample. EUR. J. Microbiol. Infect. nº18: 896-898, 1999.
- 222 Boshuizen H.C., Neppelenbroek S.E., van Bliet H., Schellekens J.F., den Boer J.W., Peeters M.F. Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of legionnaires' disease. J. Infect. Dis., nº 184: 515-518, 2001.